

## **INFORMATION TO USERS**

**This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.**

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.**

**In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.**

**Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.**

**ProQuest Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600**

**UMI<sup>®</sup>**

Université de Sherbrooke

Le fonctionnement des télomères chez des levures contenant une matrice ARN de  
télomérase modifiée

Par

Eveline Clair

Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie

juillet 2001



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

**0-612-74339-X**

**Canada**

## **TABLE DES MATIÈRES**

Liste des figures..... ii

Liste des cibles, abréviations et symboles..... v

### **Résumé**

1. Introduction ..... p. 1

2. Matériel et méthodes ..... p. 42

3. Résultats ..... p. 60

4. Discussion et Conclusion ..... p. 106

5. Remerciements..... p. 118

6. Liste des références ..... p. 119

## **LISTE DES FIGURES**

**Tableau 1. Répétitions télomériques..... p. 4**

**Figure 1. Modèle de réplication des télomères chez la levure ..... p. 13**

**Tableau 2. Composantes ARNs de la télomérase..... p. 17**

**Figure 2. Structure minimale consensus de l'ARN de la télomérase de vertébrés.. p. 27**

**Figure 3. Différentes mutations dans la région de la matrice de l'ARN TLC1 ..... p. 40**

**Figure 4. Constructions plasmidiques..... p. 45**

**Figure 5. Méthode de restriage de cellules de levure..... p. 62**

**Figure 6. Vérification de la présence de séquences télomériques humaines aux extrémités  
des chromosomes de levure..... p. 66**

Figure 7. Technique pour estimer la taille d'une extension simple-brin. ....	p. 70
Figure 8. Estimation de la taille de l'extension 3' terminale des souches contenant une matrice humaine.....	p. 71
Tableau 3. Vérification de la présence de TPE .....	p. 75
Figure 9. Survie à long terme des levures avec des séquences télomériques terminales humaines.....	p. 77
Figure 10. Analyse des télomères lors de la survie à long terme .....	p. 80
Figure 11. Niveau d'expression de hnRNP A1/UP1 .....	p. 85
Figure 12. Analyse du niveau d'activité de UP1 et NLS-UP1 par gel de retardement ... .....	p. 89
Figure 13 : Effet des protéines UP1 et NLS-UP1 aux télomères .....	p. 93

Figure 14. Analyse de complémentation des sous-unités de la télomérase humaine et de levure.....	p. 98
Figure 15. Vérification des télomères des souches haploïdes <i>tlc1Δ</i> et <i>est2Δ</i> contenant les gènes <i>TLC1</i> (avec la matrice humaine ou de levure) et <i>EST2</i> sur plasmides.....	p. 99
Figure 16. Contrôles d'expression de GST-hTERT et d'activité télomérasique...	p. 103
Tableau 4. Vérification de la complémentation entre les sous-unités des télomérases humaines et de levure.....	p. 104
Figure 17. Modèle de viabilité à long terme des souches contenant des séquences télomériques terminales humaines.....	p. 112

## **LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATION ET SYMBOLES**

**5-FOA : acide 5-fluoroorotique**

**A : adénosine**

**a.a. : acide aminé**

**ADE : adénine**

**ADN : acide déoxyribonucléique**

**ADNc : ADN complémentaire**

**ARN : acide ribonucléique**

**ARNm : acide ribonucléique messenger**

**ATP : adénosine-5'-triphosphate**

**C : cytosine**

**°C : degré Celsius**

**cm<sup>2</sup> : centimètre carré**

**CPM : compte par minute**

**C-terminal : carboxy-terminal**

**DBD : domaine de liaison à l'ADN**

**DSB : « double strand break » ou bris d'ADN double-brin**

**DTT : dithiothréitol**

**EDTA : tétraacétate d'éthylènediamine disodium**



**EST : Even Shorter Telomeres**

**EtBr : bromure d'éthidium**

**g : gramme**

**G : guanosine**

**Gal : galactose**

**gen : génération**

**Glc : glucose**

**GST : glutathione-S-transférase**

**HCl : acide chlorhydrique**

**HIS : histidine**

**hnRNP : « heterogenous nuclear ribonucleoprotein »**

**hTERT : « human telomerase reverse transcriptase »**

**kb : kilobase**

**kpb : kilopaire de base**

**kDa : kiloDalton**

**L : litre**

**LEU : leucine**

**LTR : « long terminal repeats »**

**LYS : lysine**

**M : molaire**

**min : minute**

**mg : milligramme**

**ml : millilitre**

**mm : millimètre**

**mM : millimolaire**

**mmol : millimole**

**mol/L : mole par litre**

**NaCl : chlorure de sodium**

**NaOH : hydroxyde de sodium**

**NE : extrait nucléaire**

**ng : nanogramme**

**NHEJ : « non-homologous end-joining »**

**NLS : signal de localisation nucléaire**

**nM : nanomolaire**

**nt : nucléotide**

**N-terminal : amino-terminal**

**Oligo : oligonucléotide**

**ORF : open reading frame**

**PAGE : « polyacrylamide gel electrophoresis »**

**pb : paire de base**

PCR : polymerase chain reaction

P<sub>GAL</sub> : promoteur inductible au galactose

pH : mesure de l'acidité

pmoles : picomoles

RNP : ribonucléoprotéine

Rpm : révolution par minute

RRM : « RNA recognition motif » ou motif de liaison à l'ARN

*S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*

SDS : sodium dodecyl sulfate

snoRNP : petite ribonucléoprotéine nucléolaire

*S. pombe* : *Schizosaccharomyces pombe*

T : thymidine

TBE : 89 mM Tris-borate, 89 mM acide borique, 2 mM EDTA

TBS : « Tris-buffered saline »

TBST : « Tris-buffered saline 0.1% Tween 20 »

TE : Tris-EDTA 10:1 (10 mM:1 mM)

TERT : « telomerase reverse transcriptase »

TLC1H : souches contenant la matrice de la télomérase humaine et portant des séquences télomériques humaines à l'extrémité de ses chromosomes

TLC1WT : souches contenant la matrice de la télomérase de levure

**T<sub>m</sub> : température de dénaturation**

**TRF : fragments de restriction terminaux (« terminal restriction fragments »)**

**TRP : tryptophane**

***T. thermophila* : *Tetrahymena thermophila***

**U : unité**

**URA : uracile**

**V : volt**

**μCi : microCurie**

**μg : microgramme**

**μl : microlitre**

**μM : micromolaire**

**YC : milieu Yeast Complete**

Université de Sherbrooke  
Le fonctionnement des télomères chez des levure contenant une matrice des répétés  
télomériques modifiée  
Eveline Clair  
Département de Microbiologie et Infectiologie  
Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de maître ès  
science (M.Sc.) en Microbiologie  
Août 2001

## RÉSUMÉ

Les séquences d'ADN télomériques des vertébrés sont constituées de répétitions régulières (TTAGGG)<sub>n</sub> alors que la séquence télomérique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est une séquence irrégulière G-riche (TG<sub>1,3</sub>)<sub>n</sub>. Des résultats antérieurs ont montré qu'après remplacement de la région matrice de 16 nt du gène *TLC1* de levure par la séquence matrice humaine, les souches de levure ont la capacité d'ajouter des séquences télomériques humaines aux extrémités de leurs chromosomes (Henning et al., 1998). Leurs télomères courts n'affectaient pas leur survie pour au moins 150 générations. Nous avons confirmé ces résultats en montrant l'ajout de séquences télomériques humaines aux extrémités des chromosomes de levure. Une extension simple-brin humaine d'au moins 30 pb est présente à ces extrémités et un léger effet sur la transcription des gènes localisés près des télomères est observée. Par contre, des changements survenant aux télomères dans ces souches à long terme suggèrent que les

télomères avec des terminaisons composées de séquences humaines ne sont pas stables.

L'étude de la protéine UP1 dans cette souche n'a pas révélé une interaction de celle-ci aux télomères humanisés chez la levure. Finalement, il semble que les sous-unités de la télomérase humaine ne sont pas en mesure de compléter l'absence des sous-unités de levure et ce, même dans une souche contenant des séquences télomériques terminales humaines.

## **1. INTRODUCTION**

En 1938, Hermann J. Muller constata qu'après irradiation aux rayons X, il était difficile de retrouver des cassures chromosomiques aux extrémités des chromosomes de *Drosophila melanogaster*. Il suggéra que la stabilité chromosomique nécessitait une structure terminale spécialisée et créa le terme « télomère » (Muller, 1938). Barbara McClintock complémenta ces observations en notant que des chromosomes brisés chez le maïs fusionnaient fréquemment avec d'autres, alors que les extrémités naturelles des chromosomes étaient stables (McClintock, 1939). Elle proposa donc qu'un chromosome naturel doit se différencier des chromosomes brisés par une structure amenant la stabilité aux extrémités.

### **Structure des télomères**

À l'extrémité des chromosomes eucaryotes se trouvent des structures protectrices connues sous le nom de télomères. Les télomères sont des complexes nucléoprotéiques spécialisés, formés de plusieurs répétitions de courtes séquences (5-8 nt) spécifiques à chaque espèce (Blackburn, 1991, Greider, 1991), et riches en G (discuté plus loin). Ces répétitions sont, selon les études génétiques chez *S. cerevisiae*, nécessaires et suffisantes pour la fonction des télomères (Lundblad et Szostak, 1989,

Szostak et Blackburn, 1982). La longueur de la région d'ADN télomérique est très variable (18 pb pour quelques ciliés, 5-15 kbp pour l'humain et plus de 50 kbp pour la souris (Harley, 1991, Kipling et Cooke, 1990, Starling et al., 1990, Wellinger et Sen, 1997)) et le nombre de répétitions varie entre les organismes, entre les télomères d'une même espèce et à l'intérieur d'une même cellule. Les télomères sont organisés en deux régions principales : l'ADN télomérique terminal (à l'extrémité des chromosomes) et l'ADN sous-télomérique (plus centromérique). La plus grande partie de la région télomérique terminale est double-brin, générant un brin G-riche (orienté de 5' en 3' vers l'extrémité des chromosomes) et un brin complémentaire C-riche (Zakian, 1989, Zakian, 1995). Des études chez plusieurs espèces ont montré la présence d'une extension 3' simple-brin G-riche, s'étendant au-delà du brin complémentaire C-riche (Klobutcher et al., 1981, Makarov et al., 1997, McElligott et Wellinger, 1997, Oka et al., 1980, Wellinger et al., 1993a, Wellinger et al., 1993b, Wright et al., 1997). Comme la région double-brin, cette extension est aussi liée par des protéines spécifiques (discuté plus loin). Par exemple, TBP est une protéine d'*Oxytricha* liant le simple-brin. Il s'agit d'un hétérodimère  $\alpha/\beta$  formé de deux sous-unités de 41 ( $\alpha$ ) et 56 ( $\beta$ ) kDa. Ce complexe lie fortement, mais de façon non-covalente, les extensions G-riche simple-brin des télomères (Gottschling et Cech, 1984, Gottschling et Zakian, 1986, Price et Cech, 1987). Ces deux sous-unités interagissent spécifiquement l'une avec l'autre en présence d'ADN télomérique et



forme un complexe ADN-protéine (Fang et Cech, 1993). Des évidences suggèrent que ces protéines inhiberaient la télomérase (discuté plus loin) en rendant le substrat inaccessible à l'enzyme (Froelich-Ammon et al., 1998).

Les séquences télomériques varient selon les espèces (voir le tableau 1). Chez les vertébrés, les télomères sont constitués de séquences régulières (TTAGGG) $_n$  répétées en tandem. Cette séquence est commune à tous les vertébrés (Meyne et al., 1989), à certains champignons, et aux trypanosomes (Meyne et al., 1989, Zakian, 1995). Les télomères de levures *S. cerevisiae* sont formés de 250 à 300 pb de répétitions irrégulières TG<sub>2-3</sub>(TG)<sub>1-6</sub> (nommées TG<sub>1-3</sub>) (Shampay et al., 1984, Zakian, 1995). Contrairement aux cellules de mammifères, où les longues extensions simple-brin G-riche (50-150 nt) peuvent être détectées tout au long du cycle cellulaire et même dans les cellules arrêtées en phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire (Makarov et al., 1997, McElligott et Wellinger, 1997, Wright et al., 1997), les chromosomes de *S. cerevisiae* acquièrent des extensions simple-brin d'au moins 30 nt en phase S tardive. Ces extensions furent détectées dans l'ADN natif à l'aide de sondes télomériques (Dionne et Wellinger, 1996, Wellinger et al., 1993a, Wellinger et al., 1993b). Les séquences (T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>) $_n$  et (T<sub>2</sub>G<sub>4</sub>) $_n$  constituent les télomères des ciliés (protozoaires), qui possèdent une extension simple-brin de 12-16 nt (Henderson et Blackburn, 1989, Klobutcher et al., 1981). Pour leur part, des répétitions terminales semblent absentes chez la

*Drosophile* et sont remplacées par des éléments de transposition (Biessmann et al., 1992).

Tableau 1. Répétitions télomériques (Dandjinou et al., 1999)

ORGANISME	SÉQUENCE	LONGUEUR	LONGUEUR DU SIMPLE-BRIN
Vertébrés	TTAGGG	5-100 kb (humain : 5-15 kb)	50-150 b
Plantes	T2-4AGGGG	3 kb	???
<i>S. cerevisiae</i>	TG2-3(TG)1-6	~ 350 pb	Variable (> 30 b en phase S tardive)
Ciliés (protozoaires)	TTGGGG ou TTTTGGGG	20-300 pb	~ 12-16 b

Près des télomères, on retrouve une variété de répétitions d'ADN plus complexes : les régions sous-télomériques. Ces éléments, spécifiques à chaque espèce, ont une localisation interne par rapport aux répétitions G-riche terminales et forment différentes classes de séquences d'ADN de différentes tailles (Pryde et al., 1997). Chez *S. cerevisiae*, les répétitions sous-télomériques les mieux caractérisées sont les éléments Y', séquences hautement conservées formant deux catégories de tailles majeures (5,2 et 6,7 kb). Ces éléments sont présents sur la 1/2 ou le 2/3 des télomères de plusieurs souches de laboratoire communément utilisées (Jager et Philippsen, 1989, Louis et Haber, 1990, Zakian et Blanton, 1988) et peuvent être présents en une série de plus de quatre copies sur un télomère, chaque copie annexée de courtes séquences

télomériques TG<sub>1-3</sub> (Chan et Tye, 1983, Walmsley et al., 1984). Il existe aussi d'autres éléments répétés sous-télomériques beaucoup moins conservés (éléments X), mais toujours proximaux au centromère par rapport aux éléments Y'. Chez la levure, l'élément « noyau » X semble être présent dans la région sous-télomérique de tous les télomères (Louis, 1995), mais la présence de cet élément n'est pas essentiel au maintien des chromosomes (Zakian, 1995). En effet, les éléments X et Y' ne sont pas essentiels pour la fonction des télomères de levure puisque des chromosomes de levure sans éléments X et/ou Y' peuvent se répliquer, ségréguer et recombiner lors de la mitose et de la méiose de la même façon que s'ils contenaient ces éléments. La présence de 2 à 3 copies de répétitions de 10 pb contenant au moins une copie de TTAGGG fut notée à la jonction entre les éléments X et les séquences plus centromériques (Louis et al., 1994). Les fonctions des régions sous-télomériques restent encore obscures mais l'identification de télomères de levure sans régions Y' (Zakian et Blanton, 1988) indique que ces séquences ne sont pas essentielles à la fonction des télomères. Très dynamiques, elles sont impliquées dans des échanges fréquents de séquences : elles peuvent être dispersées de télomères en télomères par recombinaison homologue (Dunn et al., 1984, Horowitz et al., 1984, Louis et Haber, 1990) (discuté plus loin). Ainsi, les éléments Y' jouent un rôle dans le maintien de la fonction des télomères et la viabilité cellulaire lorsque la réplication des télomères de levure est défectueuse (Lundblad et Blackburn, 1993). Il est à noter que l'enzyme de

restriction XhoI coupe une fois dans les éléments Y' et donne, sur « Southern blot », des bandes télomériques caractéristiques contenant ou non des éléments Y' (Louis et Haber, 1990).

### **Fonctions des télomères**

Les télomères ont plusieurs fonctions, dont deux sont essentielles pour l'intégrité du génome : ils distinguent les fins des chromosomes des bris d'ADN double brin (DSB pour « double strand break »), protégeant ainsi ces extrémités de la fusion bout à bout, la recombinaison et la dégradation par des exonucléases (Blasco et al., 1997, Sandell et Zakian, 1993, van Steensel et al., 1998, Zakian, 1995). Ils permettent aussi la réplication complète de l'ADN, permettant une ségrégation adéquate lors des divisions cellulaires (Blackburn, 1992, Greider et Blackburn, 1996, Zakian, 1989, Zakian, 1995). Le raccourcissement des télomères sous une certaine longueur critique a pour conséquence de limiter la prolifération cellulaire à long terme amenant des implications dans l'oncogénèse et dans le vieillissement cellulaire (Harley et Villeponteau, 1995). La cellule emploie donc des mécanismes pour assurer la fonction adéquate des télomères (discuté plus loin). Les télomères de *S. cerevisiae* exercent aussi un effet de position sur la transcription des gènes près des télomères

(Gottschling et al., 1990), sur le temps de réplication (Ferguson et Fangman, 1992) et sur leur localisation nucléaire (Klein et al., 1992).

### **Fonction de protection**

Les bris d'ADN chromosomiques peuvent survenir suite à différents événements biologiques ou être induits lors de manipulations expérimentales (Lundblad, 2000). Alors que les télomères sont stables et ne semblent pas être détectés comme de l'ADN endommagé, les bris d'ADN constituent un signal pour un arrêt du cycle cellulaire (médié par *RAD9* (Weinert, 1998)) et/ou pour la réparation (Lundblad, 2000). Chez *S. cerevisiae*, deux mécanismes sont possibles pour réparer les DSB : les bris sont principalement réparés par recombinaison homologue (échange génétique avec le chromosome soeur homologue) ou via un mécanisme moins efficace qui joint deux extrémités brisées (NHEJ : non-homologous end-joining) (Paques et Haber, 1999). Il arrive aussi parfois qu'un DSB puisse être réparé par l'acquisition d'un télomère. Dans les cellules de mammifères, le NHEJ (non-homologous end-joining) est la voie privilégiée pour la réparation d'un DSB. Les modèles proposent que les protéines spécifiques aux télomères et/ou les structures d'ADN spécifiques aux extrémités confèrent des propriétés empêchant les télomères d'être détectés comme étant des DSB, même si les télomères ne sont pas complètement résistants aux

événements ayant lieu aux DSB. Pour leur part, les fusions télomères-télomères sont peu fréquentes et sont rapidement résolues (Bourgain et Katinka, 1991, Murray et al., 1988) protégeant les chromosomes contre la multimérisation. Les associations télomères-télomères formeraient donc un complexe réfractaire à la fusion de chromosomes. De rares fusions de chromosomes impliquant les télomères sont toutefois détectées lors de néoplasie, telles que les tumeurs de cellules osseuses géantes (Schwartz et al., 1991).

### **Effet sur la transcription et la réplication**

Chez *S. cerevisiae*, la chromatine télomérique (hétérochromatique) a pour effet de restreindre l'expression de gènes rapporteurs localisés près des télomères (Gottschling, 1992, Gottschling et al., 1990, Renauld et al., 1993). Le TPE (telomeric position effect ou telomeric silencing) exerce aussi ses effets sur les unités de transcription situés naturellement près des fins des chromosomes (Pryde et Louis, 1999). La répression transcriptionnelle s'initie aux télomères et peut s'étendre sur plusieurs kpb vers le centromère (Gottschling, 1992, Renauld et al., 1993). La structure télomérique responsable du TPE serait un complexe multimérique sensible au débalancement stoechiométrique de ses composantes (Gottschling, 1992, Kyrion et al., 1993, Renauld et al., 1993). En effet, des souches de levure déficientes pour

certaines composantes structurales de la chromatine télomérique (mutants *sir*) subissent des altérations dans la chromatine télomérique manifestées par la perte de répression transcriptionnelle de gènes rapporteurs télomériques (Lustig, 1998). Chez les levures, le TPE nécessite les protéines KU, RAP1, SIR2, SIR3, SIR4 et RLF2. Certaines mutations dans les histones H3 et H4 indiquent qu'elles jouent aussi un rôle dans le TPE (Aparicio et al., 1991, Kayne et al., 1988, Thompson et al., 1994). Quelques gènes requis pour le TPE (dont *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *RAP1* et l'histone H4) sont aussi impliqués dans la répression transcriptionnelle à deux sites chromosomiques internes, les locus *HML* et *HMR* (« Homothallic left and right »), qui retiennent les copies non exprimées des gènes de « mating type » chez *S. cerevisiae* (Aparicio et al., 1991). Cependant, le produit du gène *SIR1* n'est requis que pour la répression transcriptionnelle aux locus *HML* et *HMR* puisqu'une mutation dans ce gène n'affecte pas la répression transcriptionnelle près des télomères (Aparicio et al., 1991).

Les centaines d'origines de réplication trouvées le long des chromosomes eucaryotes ne semblent pas être activées au même moment dans la phase S (Drouin et al., 1990). La régulation temporelle de l'activation de ces origines dans la levure *S. cerevisiae* fut étudiée et il a été montré que l'activation tardive de l'origine ARS501

semble être la conséquence de sa proximité aux télomères (Ferguson et Fangman, 1992).

### **Localisation nucléaire**

Cytologiquement, les télomères de quelques organismes (comme la *Drosophile* et les plantes (Foe et Alberts, 1985)) sont localisés de façon non-aléatoire près de l'enveloppe nucléaire (Foe et Alberts, 1985, Rawlins et Shaw, 1990). Pour d'autres organismes, des évidences montrent qu'ils s'associent avec la matrice nucléaire (Cockell et al., 1995, Luderus et al., 1996). Les agrégats de télomères de trypanosomes sont distribués asymétriquement, parfois concentrés à un pôle du noyau (Chung et al., 1990). Chez *S. cerevisiae*, les télomères sont distribués à la périphérie nucléaire (Klein et al., 1992). Pour sa part, la distribution spatiale des télomères de cellules de mammifères varie selon le type cellulaire, le chromosome et l'étape du cycle cellulaire (Gilson et al., 1993a, Manuelidis et Borden, 1988, Vourc'h et al., 1993). L'association télomère-membrane pourrait favoriser l'appariement approprié des chromosomes en réduisant la liberté de mouvement des séquences près des télomères et en concentrant les sites d'attachement des chromosomes dans une région limitée du noyau (Lima-de-Faria et Mitelman, 1986, Rasmussen et Holm, 1980). Ceci semble être important lors de la méiose car au moment de la prophase de la première

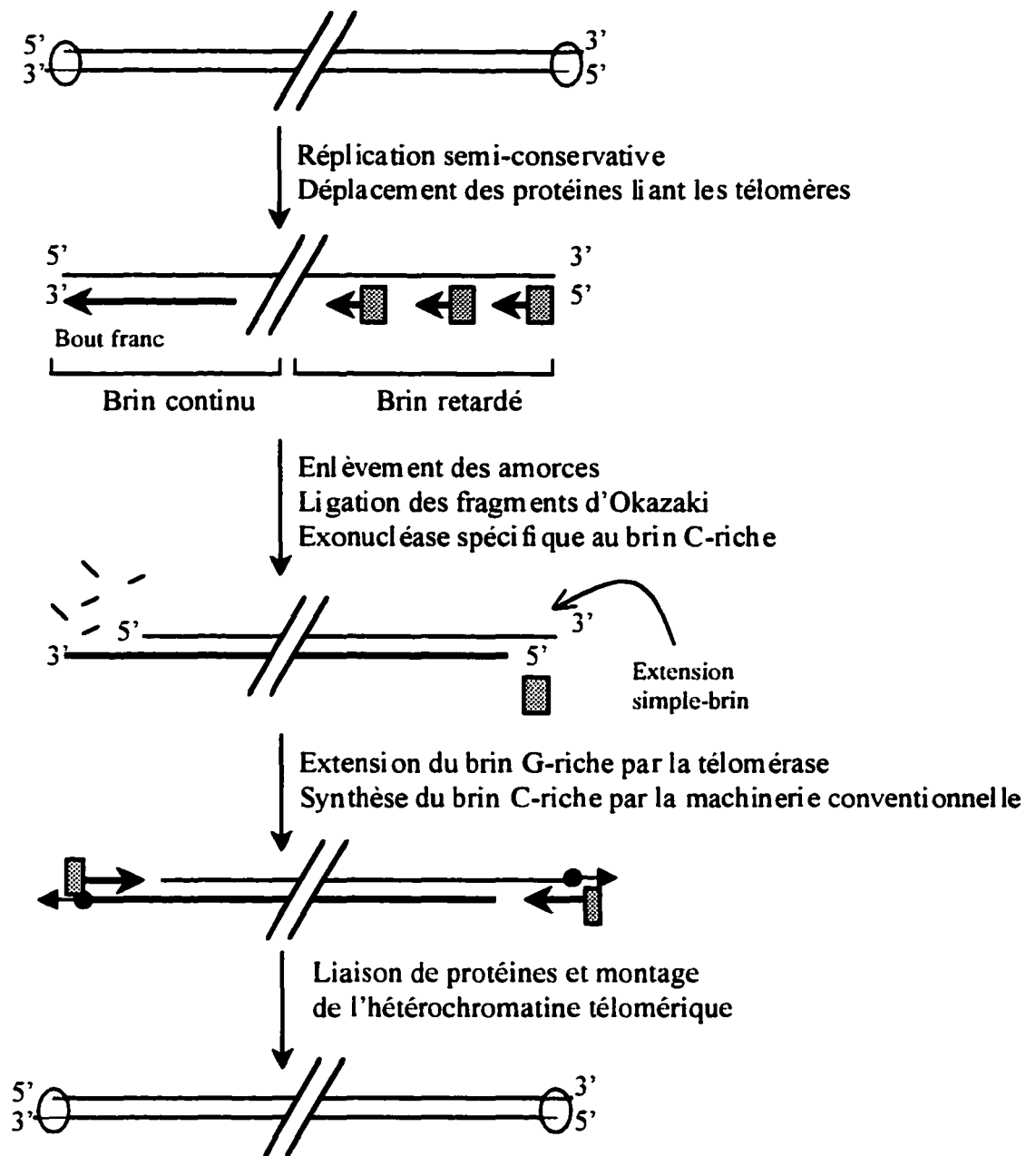


division méiotique, les télomères sont regroupés près de la membrane nucléaire. Ce phénomène semble universel puisqu'il fut décrit chez les plantes, plusieurs espèces animales et les levures (Dresser et Giroux, 1988, Lima-de-Faria et Mitelman, 1986, Rasmussen et Holm, 1980). Les télomères pourraient donc être impliqués dans l'organisation de l'architecture nucléaire (Gilson et al., 1993a).

### **Le problème de la réplication aux télomères**

Lors de la réplication des chromosomes, les ADN polymérases synthétisent l'ADN de 5' en 3' et requièrent une amorce (produite par l'ADN primase) pour initier la synthèse. Après la réplication semi-conservative de l'ADN linéaire, une des deux molécules filles générée possède une courte extension 3' simple-brin (due à l'enlèvement de la dernière amorce d'ARN) alors que l'autre possède un bout franc (voir figure 1) (Lingner et al., 1995, Wellinger et al., 1996). Ainsi, le brin retardé des extrémités d'ADN n'est pas complètement répliqué (Olovnikov, 1973, Olovnikov, 1996, Watson, 1972). Il a été montré qu'une longue extension G-riche est aussi présente à l'extrémité répliquée par la synthèse du brin continu et que cette extension peut être générée en absence de télomérase (Dionne et Wellinger, 1996, Wellinger et al., 1996). Ainsi, l'implication d'une exonucléase spécifique 5'-3' (encore inconnue) serait importante pour la réplication des télomères, permettant la formation d'une

structure terminale appropriée sur tous les télomères et fournissant l'extension 3' simple-brin nécessaire à la télomérase (discuté plus loin) (Lingner et Cech, 1996). Par la suite, des évidences suggèrent que l'allongement de l'extension G-riche par la télomérase est coordonnée avec la réplication du brin C-riche par la machinerie conventionnelle et qu'elle dépend de l'ADN primase et des ADN polymérases  $\alpha$  et  $\delta$  (Diede et Gottschling, 1999, Dionne et Wellinger, 2000).



- Télosome: protéines liant les extrémités (Ku et autres protéines hétérochromatiques)
- Amorce d'ARN de 8-12 bases ●→ ADN TG<sub>1-3</sub> synthétisé par la télomérase

Figure 1. Modèle de réplication des télomères chez la levure (Dandjinou, 1999). La réplication semi-conservative aux deux extrémités d'un chromosome pour une des deux molécule fille est schématisée. La réplication conventionnelle au brin continu laisse possiblement un bout franc à une extrémité de la molécule. Cependant, la réplication du brin retardé laisse un trou d'au moins 8-12 bases après l'enlèvement de l'amorce d'ARN du dernier fragment d'Okazaki à l'autre extrémité. Une exonucléase brin-spécifique génère ensuite une extension G-riche aux deux télomères des molécules. L'élongation par la télomérase et le remplissage par l'ADN polymérase génèrent des extensions 3' simple-brin sur tous les télomères après l'enlèvement des amorces ARN.

## La télomérase

En absence d'un mécanisme spécialisé pour maintenir les télomères, plusieurs cycles de réplication entraîneraient un raccourcissement progressif des extrémités (Feng et al., 1995, Levis, 1989, Lundblad et Szostak, 1989, McEachern et Blackburn, 1995, McEachern et Blackburn, 1996, Singer et Gottschling, 1994). Le maintien de l'ADN télomérique fut compris en identifiant une activité télomérase chez plusieurs espèces de ciliés et dans des extraits cellulaires de *Xenopus*, de souris et d'humain (Greider et Blackburn, 1985, Greider et Blackburn, 1987, Greider et Blackburn, 1989, Mantell et Greider, 1994, Morin, 1989, Prowse et al., 1993, Shippen-Lentz et Blackburn, 1989, Zahler et Prescott, 1988). La télomérase fut initialement identifiée chez le cilié *T. thermophila* comme une ribonucléoprotéine (RNP) (Greider et Blackburn, 1985). Son activité enzymatique est responsable de l'ajout des répétitions télomériques aux extrémités 3' des chromosomes (Greider et Blackburn, 1985). Elle est constituée de deux principales composantes ainsi que plusieurs protéines associées. La première composante majeure est un ARN essentiel qui fournit la matrice pour l'ajout des répétitions (Greider et Blackburn, 1985). La deuxième est une sous-unité protéique essentielle avec une activité transcriptase inverse (Counter et al., 1997, Greider, 1996, Greider et Blackburn, 1989). L'élongation du brin G-riche des télomères se fait par transcription inverse d'une partie de la composante ARN

contenant une séquence complémentaire aux répétitions télomériques. La télomérase repositionne ensuite l'extrémité 3' de l'amorce nouvellement allongée au début de la matrice et procède ainsi à de nouvelles élongations.

### **Structure de la télomérase**

Le gène codant pour la sous-unité catalytique fut tout d'abord identifié chez le protozoaire *Euplotes aediculatus* (Lingner et Cech, 1996). Les TERTs (« telomerase reverse transcriptase »), contiennent sept motifs RT (« reverse transcriptase ») (1, 2, A, B', C, D et E) conservés parmi les transcriptases inverses et un motif T (télomérase-spécifique) (Lingner et al., 1997b, Nakamura et al., 1997). L'extrémité N-terminale des TERTs de ciliés (protozoaires) partagent un motif commun (motif CP) très peu conservé parmi les sous-unités catalytiques d'autres organismes (Bryan et al., 1998). TERT est maintenant identifié dans plusieurs organismes, incluant les levures bourgeonnantes (*S. cerevisiae*) et de fission (*S. pombe*), la souris, l'humain et les plantes (Counter et al., 1997, Fitzgerald et al., 1999, Greenberg et al., 1998, Harrington et al., 1997, Kilian et al., 1997, Lingner et al., 1997a, Martin-Rivera et al., 1998, Meyerson et al., 1997, Nakamura et al., 1997).

L'activité télomérasique est aussi dépendante de la molécule intrinsèque d'ARN qui contient une courte séquence matrice (Greider et Blackburn, 1989). Cette dernière a été clonée chez plusieurs organismes incluant *Tetrahymena*, la levure et l'humain (Feng et al., 1995, Greider et Blackburn, 1989, Nugent et Lundblad, 1998, Singer et Gottschling, 1994) et contient un domaine équivalant à ~1,5 répétitions de séquence complémentaire aux télomères (Autexier et Greider, 1994, Greider et Blackburn, 1996, Lingner et al., 1994, Shippen-Lentz et Blackburn, 1990, Yu et Blackburn, 1991) (voir tableau 2). Les sous-unités ARN de différents organismes diffèrent significativement en terme de taille et de séquence et on retrouve très peu d'homologie entre les ARNs de différentes espèces à l'extérieur de la région matrice. De plus, la structure secondaire conservée des ARNs de télomérase de ciliés est absente des séquences entourant la région matrice de l'ARN de *S. cerevisiae* (Romero et Blackburn, 1991).

Tableau 2 : Composantes ARNs de la télomérase (Greider, 1996)

Organisme	Séquence télomérique (5'-3')	Séquence matrice ARN (3'-5')	Longueur de l'ARN	Référence
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG	CAACCCCAA	159	(Greider et Blackburn, 1989)
<i>Euplotes</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCCA- AAACC	190	(Shippen-Lentz et Blackburn, 1990)
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCCA- AAACC	190	(Lingner et al., 1994, Melek et al., 1994)
Humain	TTAGGG	CUAACCCUAAC	451	(Feng et al., 1995)
Souris	TTAGGG	CCUAACCCU	451	(Blasco et al., 1995)
<i>S. cerevisiae</i>	TG2-3(TG)1-6	CACCACACCC- ACACAC	~ 1300	(Singer et Gottschling, 1994)
<i>K.lactis</i>	TTTGATTAGG- TATGTGGTGT	UCAAUCCGU- ACACCAUAC- CUAAUCAA	~ 1300	(McEachern et Blackburn, 1995)

### La télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, au moins cinq gènes sont requis pour la voie de réplication par la télomérase (Lendvay et al., 1996, Lundblad et Szostak, 1989, Nugent et al., 1996, Singer et Gottschling, 1994). *TLC1* et *EST2* encodent respectivement les sous-unités ARN et catalytique (Counter et al., 1997, Greider, 1996, Lingner et al., 1997a). Les souches délétées pour un de ces deux gènes essentiels ne possèdent plus d'activité

télomérasique et montrent un défaut de réplication aux télomères caractéristique d'une déficience en télomérase : raccourcissement progressif des télomères et diminution graduelle dans la viabilité cellulaire (phénotype *Est<sup>-</sup>* pour « Ever Shorter Telomeres ») (Cohn et Blackburn, 1995, Lingner et al., 1997a, Lundblad et Szostak, 1989, Singer et Gottschling, 1994). Des mutations dans deux gènes supplémentaires – *EST1* et *EST3* – confèrent le même phénotype *Est<sup>-</sup>* (Lendvay et al., 1996, Lundblad et Szostak, 1989), mais n'abolissent pas l'activité catalytique *in vitro* (Cohn et Blackburn, 1995, Lingner et al., 1997a). Pour sa part, une délétion du gène *CDC13* entraîne une mort immédiate (Garvik et al., 1995).

## **TLC1**

Le gène encodant la composante ARN chez *S. cerevisiae* (*TLC1* pour « telomerase component 1 ») est en une copie sur le chromosome II et contient la séquence matrice CACCACACCCACACAC (voir le tableau 2) (Singer et Gottschling, 1994). La délétion du gène amène un raccourcissement progressif des télomères d'environ trois pb par génération (Singer et Gottschling, 1994). Une diminution de vitesse de croissance accompagne une baisse de viabilité de 50% dans les souches *tlc1* après 75-100 générations. Des supprimeurs peuvent toutefois survenir à ces générations, comme c'est le cas pour les souches *est1* (Lundblad et



Blackburn, 1993) (discuté plus loin). Pour sa part, la surexpression de *TLC1* amène un raccourcissement des télomères à 90-220 pb et une suppression du TPE (reflétant une perte de structure spéciale de la chromatine). L'effet dominant-négatif causé par la surexpression de *TLC1* origine probablement d'une interaction normale entre l'ARN et un facteur télomérique important pour la répression transcriptionnelle (Peterson et al., 2001). Dans la levure, on retrouve de 5 à 10% de *TLC1* polyadénylé à l'état stable (Chapon et al., 1997). Il est donc possible que la forme polyadénylée de *TLC1* soit le précurseur de la forme mature.

## **EST2**

*EST2* fut identifié en 1996, puisqu'une mutation dans cet ORF entraînait un phénotype *Est<sup>-</sup>* (Lendvay et al., 1996). Par la suite, il fut démontré que ce gène, situé sur le chromosome XII encodait la sous-unité catalytique de la télomérase (Counter et al., 1997, Lingner et al., 1997a). Est2p (103 kDa), physiquement associée à la télomérase constitue une composante des complexes télomérasiques actifs des cellules. Des mutations ciblées dans les motifs RT abolissent l'activité télomérasique *in vitro* (Counter et al., 1997), amène un raccourcissement des télomères ainsi qu'un phénotype de sénescence *in vivo* (Lendvay et al., 1996, Lingner et al., 1997a, Zakian, 1996). Deux motifs RT d'Est2p sont caractérisés par trois acides aspartiques

conservées parmi les ADN polymérases ARN-dépendantes (Poch et al., 1989, Xiong et Eickbush, 1990) et une mutation ponctuelle d'une des acides aspartiques indique que ces résidus sont essentiels à la fonction de l'enzyme.

### **EST3**

La fonction spécifique d'Est3p n'a pas encore été déterminée. Cependant, des études récentes ont montré qu'Est3p est associée à l'ARN TLC1 et à l'activité enzymatique de la télomérase, et ce, même en conditions stringentes (Hughes et al., 2000). Est3p joue donc un rôle dans la réplication des télomères comme sous-unité de la télomérase.

### **EST1**

Est1p fut la première composante du complexe de réplication des télomères à être identifiée (Lundblad et Szostak, 1989). Les cellules *est1* possèdent tous les phénotypes *Est<sup>-</sup>* (décrits plus tôt), suggérant son rôle comme composante essentielle de la machinerie de réplication des télomères de levure (Lundblad et Blackburn, 1990, Lundblad et Szostak, 1989). Même si la majorité des cellules *est1* meurent (Lundblad et Szostak, 1989) une sous-population échappe à la mort cellulaire. Est1p lie les

substrats simple-brin télomériques (avec 500 fois moins d'affinité que Cdc13p) (Lin et Zakian, 1996, Nugent et al., 1996, Virta-Pearlman et al., 1996), mais contrairement à Cdc13p (discuté plus loin), elle requiert une extrémité 3' libre. Est1p est aussi associée à l'ARN *TLC1* (Hughes et al., 2000, Lin et Zakian, 1995, Steiner et al., 1996). Un allèle mutant de *EST1* (*est1-47*) compromet spécifiquement l'habileté de la télomérase à accéder aux fins des chromosomes (Evans et Lundblad, 1999). Cette mutation affecte la réplication télomérique, même si la protéine mutée reste physiquement associée à la télomérase, suggérant un défaut dans l'accès aux télomères (similaire à l'allèle *cdc13-2<sup>est</sup>*).

## **CDC13**

La protéine responsable de la protection d'extrémité télomérique la mieux caractérisée est encodée par le gène essentiel *CDC13/EST4* (Garvik et al., 1995, Lendvay et al., 1996, Lundblad, 2000). Faiblement associée à la télomérase, Cdc13p (pour « Cell Division Cycle ») constitue une composante de la chromatine télomérique (Bourns et al., 1998, Evans et Lundblad, 1999, Hughes et al., 2000, Lin et Zakian, 1996, Nugent et al., 1996). Cette protéine lie l'ADN télomérique simple-brin de levure *in vitro* avec une forte affinité et spécificité (Lin et Zakian, 1996, Nugent et al., 1996). Cdc13p (924 a.a.) montre aussi une affinité pour les séquences

télomériques humaines, bien que dix fois plus faible que pour les séquences de levure (Lin et Zakian, 1996). Contrairement aux autres composantes de la télomérase (Lendvay et al., 1996, Lingner et al., 1997a, Lundblad et Szostak, 1989, Singer et Gottschling, 1994), Cdc13p est requise pour la viabilité cellulaire immédiate (Garvik et al., 1995). En 2000, Hughes et al. ont cartographié le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA binding domain) de *CDC13*. Une seule mutation faux-sens dans ce domaine résulte en une liaison d'ADN thermolabile et une létalité conditionnelle de la levure (Hughes et al., 2000) La liaison à l'ADN semble donc essentielle à la fonction de Cdc13p.

On attribue au moins deux rôles pour Cdc13p aux télomères : protection des télomères des dommages à l'ADN (Diede et Gottschling, 1999, Garvik et al., 1995) et recrutement de la fonction télomérasique *in vivo* (Evans et Lundblad, 1999, Nugent et al., 1996). En absence de Cdc13p fonctionnelle (mutant *cdc13-1*), une dégradation du brin C-riche résulte en une région simple-brin allongée induisant un arrêt *RAD9*-dépendant dans la phase G2 du cycle cellulaire (Garvik et al., 1995). Cdc13p protégerait ainsi les télomères de l'action non-régulée de nucléases. Les longues extensions simple-brin G-riche détectées en phase S tardive (lorsque la réplication conventionnelle est presque complétée) (Wellinger et al., 1993b) constitueraient un substrat pour la liaison de protéines liant les extrémités simple-brin tel que Cdc13p.

Cdc13p collabore avec Stn1p (pour « suppressor of *c*dc thirteen 1 ») et Ten1p (pour « protein involved in Telomeric pathways in association with Stn1, number 1 ») pour conférer la protection aux télomères. En effet, Stn1p interagit avec Cdc13p et une Stn1p non-fonctionnelle active un arrêt *RAD9*-dépendant (Grandin et al., 1997). Ten1p est aussi impliquée dans la régulation de la longueur des télomères (des mutants *ten1* ont des télomères allongés) et dans la protection des extrémités télomériques (arrêt *RAD9*-dépendant lors de dommages à l'ADN télomérique). Il fut donc proposé qu'un complexe CDC13-STN1-TEN1 fonctionne dans le recrutement de la télomérase aux extrémités télomériques et dans la protection physique de ces extrémités (Grandin et al., 2001).

Récemment, il fut suggéré que Est1p et Cdc13p co-médieraient l'accès de la télomérase aux télomères (Evans et Lundblad, 1999). La télomérase serait recrutée aux télomères grâce à une interaction directe mais faible entre Cdc13p et l'enzyme. Une fusion du DBD<sub>Cdc13</sub> à une protéine associée à la télomérase a la capacité d'alléger le besoin pour les fonctions d'accès de Cdc13p ou Est1p à la télomérase puisque l'accès de la télomérase aux télomères est accrue par des fusions du DBD<sub>Cdc13</sub> à Est1p, Est2p ou Est3p, amenant un allongement substantiel des télomères. Le raccourcissement des télomères observé dans une souche mutante *cdc13-2<sup>est</sup>* (où la télomérase est toujours active) pourrait donc s'expliquer par une réduction

d'interaction entre Cdc13p et l'enzyme (Lendvay et al., 1996, Lingner et al., 1997a, Nugent et al., 1996).

## **La télomérase humaine**

### **hTERT**

*hTERT* code pour la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (127 kDa) qui contient les motifs RT conservés ainsi que le motif T (Harrington et al., 1997, Kilian et al., 1997, Meyerson et al., 1997, Nakamura et al., 1997). L'activité *in vitro* nécessite les extrémités N- et C-terminale de TERT (non-conservées) ainsi que son domaine de liaison à l'ARN (Lai et al., 2001). Des études ont montré que le niveau basal d'ARNm d'*hTERT* est plus élevé dans les lignées cellulaires immortelles avec une télomérase active (Kim et al., 1994) que dans n'importe quelle souche cellulaire sans télomérase fonctionnelle (Nakamura et al., 1997). L'activité télomérase corrèle plus fortement avec l'abondance d'ARNm de *hTERT* qu'avec l'ARN de la télomérase (*hTR*) (Feng et al., 1995).

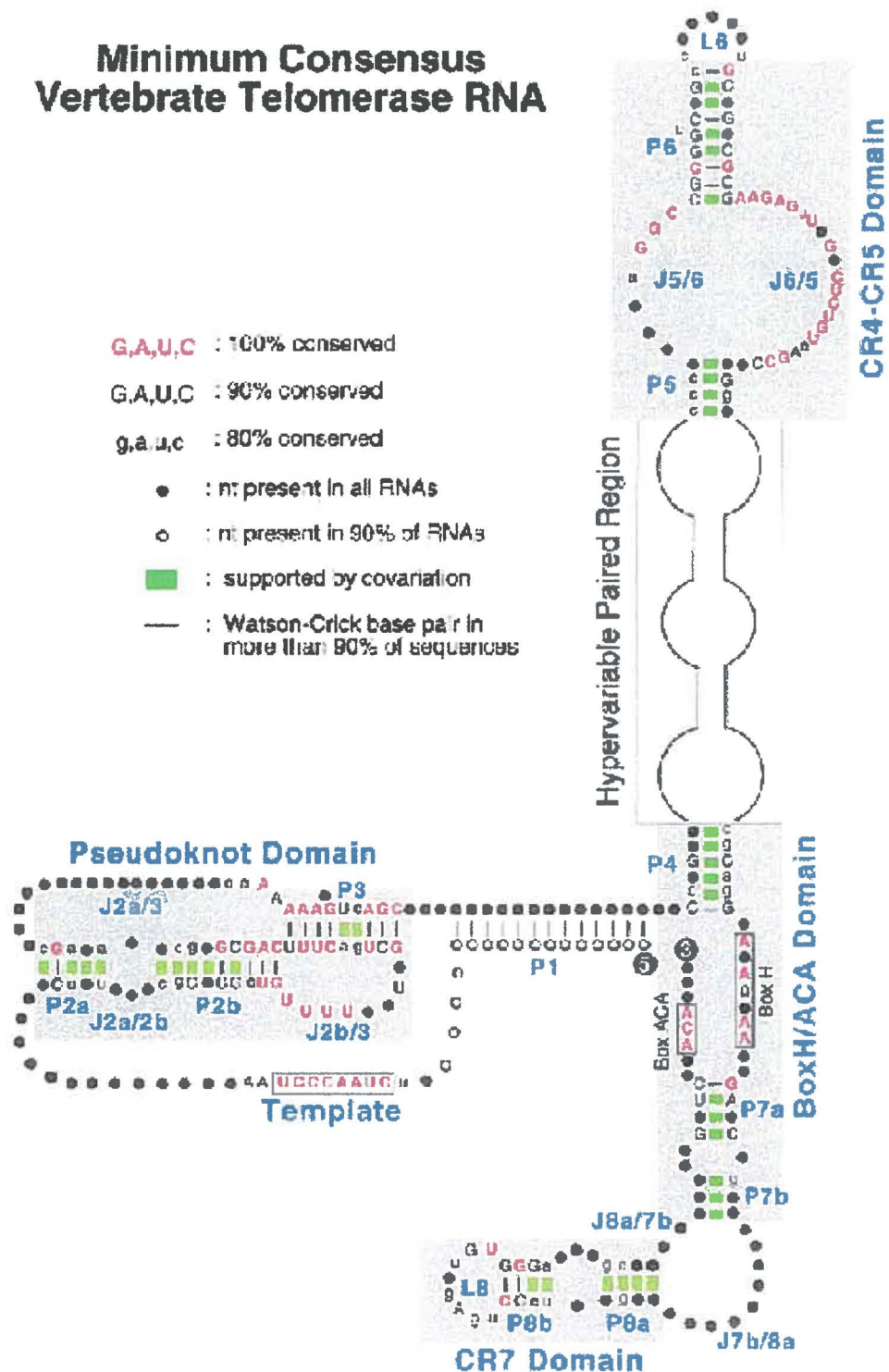
### **hTR**

La composante ARN de la télomérase humaine (*hTR*, 451 nt) n'existe qu'en une seule copie sur le chromosome III (Feng et al., 1995). La séquence minimale conservée de la matrice dans les ARNs de télomérases de vertébrés est de huit nucléotides, CUAACCCU, indiquant que cette courte région est suffisante pour la fonction de matrice (Chen et al., 2000). Chez l'humain, des nucléotides additionnels pourraient servir de matrice pour la synthèse de répétitions télomériques TTAGGG. En effet, la région matrice pourrait comprendre onze nt (5'-CUAACCCUAAC-3') complémentaires à la séquence télomérique humaine (TTAGGG)<sub>n</sub> (voir tableau 2). Normalement, on retrouve *hTR* en petite quantité dans le nucléole et sa forme mature est non-polyadénylée. Une comparaison d'*hTR* avec l'homologue de souris (Blasco et al., 1995) révèle des régions conservées avec une légère similarité près de la matrice. La structure secondaire d'*hTR* récemment proposée, basée sur une comparaison phylogénétique des composantes ARN de télomérases de plusieurs espèces de vertébrés montre quatre éléments structuraux conservés universellement dans la structure secondaire : le domaine pseudoknot, le domaine CR4-CR5, la boîte H/ACA et le domaine CR7 (Chen et al., 2000) (figure 2). On retrouve même une topologie structurale similaire entre l'ARN de télomérase de vertébrés et de ciliés (Romero et Blackburn, 1991). Le domaine H/ACA dans la partie 3' de *hTR* est important pour son accumulation *in vivo* (Mitchell et al., 1999), la maturation de l'extrémité 3' ainsi que le transport intra-nucléaire, suggérant qu'*hTR* s'associe aux protéines H/ACA

snoRNP (petits RNPs nucléolaires) (Ganot et al., 1997, Ni et al., 1997, Tollervey et Kiss, 1997), comme c'est le cas avec les snoRNP de *S. cerevisiae* (Dez et al., 2001). Deux régions d'hTR interagissent indépendamment avec hTERT *in vivo* et *in vitro* et une de ces régions est contenue dans le domaine H/ACA à l'extrémité 3' d'hTR (nt 211-451) (Mitchell et Collins, 2000).



Figure 2. Structure minimale consensus de l'ARN de la télomérase de vertébrés (Chen et al., 2000).



## **Implication de la télomérase**

Chez les ciliés et les levures, la télomérase est régulée et la longueur moyenne des télomères est maintenue constante (Cooper et al., 1997, Klobutcher et al., 1981, Marcand et al., 1997, McEachern et Blackburn, 1995, Zakian, 1995). Cependant, dans la majorité des cellules somatiques humaines, l'activité télomérase ne peut être détectée et les télomères raccourcissent lors des divisions cellulaires successives (Harley et al., 1990, Harley et al., 1994, Hastie et al., 1990). Pour qu'une cellule tumorale subisse une prolifération soutenue au-delà des limites de la sénescence cellulaire, elle doit réactiver la télomérase ou un mécanisme alternatif (ALT) afin de maintenir les télomères. En effet, l'activité télomérase est observée dans la plupart des lignées cellulaires immortalisées et dans environ 85% des tumeurs humaines (Counter et al., 1992, Kim et al., 1994, Shay et Bacchetti, 1997). La capacité des cellules à exprimer l'activité télomérase est limitée par la présence ou l'absence d'hTERT puisque toutes les cellules somatiques humaines contiennent hTR de façon constitutive. Cependant, les lignées cellulaires tumorales expriment plus de hTR que les cellules somatiques normales (Feng et al., 1995). Contrairement à l'humain (Kim et al., 1994), l'activité télomérase est directement proportionnelle à la concentration d'ARN chez la souris (Blasco et al., 1995, Chadeneau et al., 1995, Prowse et Greider,

1995). Les composantes protéiques de la télomérase pourraient ainsi être régulées de façon stringente dans les cellules humaines mais pas dans les cellules de souris.

### **Autres protéines télomériques importantes chez *S. cerevisiae***

#### **Rap1p**

L'activité de la télomérase est régulée pas la quantité des protéines liant les télomères (Marcand et al., 1997). Rap1p (repressor activator protein 1) interagit avec l'ADN télomérique double-brin *in vivo* via ses deux domaines de type Myb (Konig et al., 1996) et semble être la protéine majeure liant les télomères chez la levure (Klein et al., 1992). On retrouve un site consensus de liaison de Rap1p (RC/AAYCCRYNCAYY) par 18 pb d'ADN télomérique (Conrad et al., 1990, Gilson et al., 1993b). Une diminution de liaison de Rap1p à l'ADN télomérique provoque un allongement télomérique (Zakian, 1996), lui conférant un rôle de régulateur négatif. Rap1p contribue aussi à la formation du « télosome », complexe de protéines localisés aux télomères. L'assemblage est médié en partie par son domaine C-terminal, qui interagit avec Rif1p et Rif2p (RAP1 interacting factor 1 et 2), deux facteurs impliqués dans la répression transcriptionnelle du « mating-type » et le contrôle de la longueur des télomères (Hardy et al., 1992, Wotton et Shore, 1997). Rap1p recrute aussi Sir3p

(« silent information regulator 3 ») et Sir4p aux télomères, elles-mêmes interagissant avec les nucléosomes adjacents via des interactions spécifiques avec les extrémités N-terminales des histones H3 et H4 (Hecht et al., 1995). Ces interactions établissent une structure chromatique altérée dans l'ADN adjacent aux télomères (Gottschling et al., 1990).

### **L'hétérodimère KU**

Originellement identifiée comme antigène autoimmun localisé au noyau et connu pour son rôle dans la réparation de DSB (Jackson et Jeggo, 1995, Lieber et al., 1997, Roth et al., 1995, Weaver, 1995), l'hétérodimère KU (70 et 80 kDa) protège aussi les extrémités télomériques. KU semble être présent dans toutes les cellules eucaryotes, suggérant une fonction conservée et importante. Comme pour son homologue chez les mammifères, KU de levure (YKU70 et YKU80) lie les extrémités d'ADN seulement sous sa forme hétérodimérique (Milne et al., 1996). Une délétion de *KU* amène une croissance sensible à la température (Feldmann et al., 1996), de longues extensions 3' simple-brin persistant tout le long du cycle cellulaire (Gravel et al., 1998, Polotnianka et al., 1998), une diminution de la longueur des séquences télomériques et une structure terminale modifiée (réduction du TPE) (Boulton et Jackson, 1996, Gravel et al., 1998, Laroche et al., 1998, Nugent et al., 1998). Des

immunoprécipitations de la chromatine montrent que KU lie directement les télomères de *S. cerevisiae* in vivo (Gravel et al., 1998). Ainsi, KU joue un rôle direct dans l'établissement d'une structure normale des extrémités chromosomiques de levure. Récemment, il fut proposé que cette protéine pourrait aussi aider à recruter ou activer la télomérase aux télomères via une interaction avec une portion de 48 nt de l'ARN de TLC1 (Peterson et al., 2001). Chez l'humain, KU interagit avec TRF1 (« TAGGG repeat-binding factor 1 ») (discuté plus loin) (Hsu et al., 2000) et cette interaction est requise pour localiser KU à l'ADN télomérique interne.

## **TBF1**

TBF1 (« telomeric-binding factor 1 »), une protéine essentielle chez la levure, a comme particularité de lier les répétitions d'ADN T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub> (séquence télomérique humaine) avec une forte affinité. Elle semble aussi interagir avec RAP1 (Brigati et al., 1993).

## **Autres protéines télomériques importantes chez l'humain**

### **HnRNP A1/UP1**

**HnRNP A1** (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) est une protéine abondante associée à la majorité des transcrits naissants dans la cellule et qui contient deux RRM<sub>s</sub> (RNA recognition motif). La région C-terminale est particulièrement riche en glycine et inclue plusieurs répétitions Arg-Gly-Gly (RGG) qui constituent un motif de liaison à l'ARN additionnel (Kiledjian et Dreyfuss, 1992). Une séquence de 39 acides aminés (M9) est aussi localisée près de l'extrémité C-terminale et est impliquée dans la localisation nucléaire de la protéine (Izaurralde et Adam, 1998, Michael et al., 1995, Siomi et Dreyfuss, 1995). Située surtout dans le noyau, hnRNP A1 (subséquemment nommée A1) voyage continuellement entre le noyau et le cytoplasme (Pinol-Roma et Dreyfuss, 1992) et semble impliquée dans le transport d'ARNm mature (Izaurralde et Adam, 1998). Un des rôles importants d'hnRNP A1 est la modulation de l'utilisation des sites d'épissage alternatif 5' de façon concentration-dépendante : A1 active les sites d'épissage 5' distaux et encourage l'exclusion d'exons alternatifs *in vitro* et *in vivo* (Caceres et al., 1994, Fu et al., 1992, Mayeda et Krainer, 1992, Yang et al., 1994) et autorégule l'épissage alternatif de son propre ARN pré-messager (Chabot et al., 1997).

A1 (320 a.a., 34 kDa) (Cobianchi et al., 1986) lie fortement les courts ARNs contenant une ou plusieurs copies du motif UAGGGA/U (Abdul-Manan et al., 1996, Burd et Dreyfuss, 1994, Mayeda et al., 1998), séquence identique à la répétition

télomérique humaine, d(TTAGGG)<sub>n</sub>. Récemment, A1 a été montré pour être impliquée dans la biogénèse des télomères (LaBranche et al., 1998) puisque des cellules de souris dans lesquelles l'expression d'A1 est déficiente ont des télomères courts. Un rétablissement de l'expression d'A1 dans ces cellules résulte en un rallongement des télomères. Ceci concorde avec le fait que A1 peut lier spécifiquement les répétitions d'ADN télomérique humain d(TTAGGG)<sub>n</sub> simple-brin *in vitro* (Erlitzki et Fry, 1997, Ishikawa et al., 1993, McKay et Cooke, 1992).

Le fragment protéolytique d'hnRNPA1, connu sous le nom d'UP1 (unwinding protein 1) (Herrick et Alberts, 1976, Pandolfo et al., 1985, Riva et al., 1986) contient le 2/3 de la portion N-terminale d'hnRNP A1 (incluant les deux RRM sans le domaine glycine-riche). UP1 est suffisant pour lier l'ADN télomérique (Ishikawa et al., 1993) et maintenir la longueur des télomères (LaBranche et al., 1998). Cependant, alors qu'A1 et UP1 lient les répétitions télomériques simple-brin des vertébrés directement et spécifiquement *in vitro*, seule UP1 est capable de recruter l'activité télomérasique dans les lysats cellulaires (LaBranche et al., 1998). L'existence d'UP1 *in vivo* reste controversée dû à la possibilité d'une protéolyse d'A1 lors du fractionnement cellulaire (Pandolfo et al., 1985, Riva et al., 1986, Valentini et al., 1985). Il est à noter que le niveau d'expression d'A1 augmente lors de la transition de l'état cellulaire quiescent à l'état prolifératif (LeSturgeon et al., 1978) et est élevé

dans les lignées cellulaires germinales, immortalisées et cancéreuses (Kamma et al., 1995, Zhang et al., 1997). Quelques cellules immortalisées et cancéreuses ne possèdent pas d'activité télomérase détectable (Bryan et al., 1995, Kim et al., 1994, Rogan et al., 1995), alors la liaison spécifique d'A1/UP1 aux télomères pourrait aussi contribuer à leur stabilité en protégeant les extensions simple-brin de la dégradation.

### **TRF1 et TRF2**

TRF1 et TRF2 (« TTAGGG repeat-binding factor 1 or 2 »), deux protéines de mammifères ayant des séquences et des structures similaires, lient l'ADN télomérique double-brin via des motifs de type Myb (Bilaud et al., 1997, Broccoli et al., 1997, Chong et al., 1995). Chacune contribue séparément à la régulation de la longueur des télomères (Broccoli et al., 1997). La surexpression de TRF1 amène un raccourcissement progressif des télomères alors que son absence provoque un rallongement (van Steensel et de Lange, 1997). TRF1 interagit aussi avec TIN2 (« TRF1-interacting nuclear protein 2 »), une protéine impliquée dans la régulation de la longueur des télomères (Kim et al., 1999), ainsi que la tankyrase (« TRF-interacting, ankyrin-related ADP-ribose polymerase ») (Smith et de Lange, 1999). Pour sa part, TRF2 aurait un rôle protecteur aux télomères puisque sa surexpression résulte en un raccourcissement des télomères (Smogorzewska et al., 2000) et qu'une



perte de fonction entraîne des événements de fusion télomère-télomère (conséquence de structure terminale modifiée), dû à une perte des extensions 3' G-riche (van Steensel et de Lange, 1997). TRF2 est donc impliquée dans le maintien de l'extension simple-brin 3'.

Des micrographies électroniques d'ADN télomérique de souris et d'humain ont révélé que l'extension simple-brin 3' G-riche envahit la région double-brin du télomère pour générer une structure en lasso (T-loop) (Griffith et al., 1999). En liant les régions télomériques double-brin, TRF1 facilite la formation de boucle via ses propriétés à courber l'ADN (Bianchi et al., 1997, Bianchi et al., 1999, Griffith et al., 1998). De plus, TRF2 encourage la formation de T-loop *in vitro* et se localise à la jonction où l'extrémité 3' envahie les séquences télomériques, suggérant que TRF2 et/ou des protéines associées aident à l'invasion du brin. Ce modèle peut expliquer comment une structure plus complexe rend un télomère difficilement accessible à la télomérase.

### **Voies alternatives**

Lorsque la réplication des télomères par la télomérase est abolie, des voies alternatives sont capables de ramener une fonction télomérique suffisante pour une

viabilité cellulaire continue (Bryan et al., 1995, Lundblad et Blackburn, 1993, McEachern et Blackburn, 1996, Nakamura et al., 1998, Sheen et Levis, 1994, Teng et Zakian, 1999). Chez *S. cerevisiae*, ces survivants télomérase-indépendant forment deux classes (discuté plus loin): ils montrent une amplification globale des répétitions télomériques G-riches ou des régions sous-télomériques (Y') (Lundblad et Blackburn, 1993). Cette réorganisation génomique fait en sorte que les survivants retrouvent un phénotype de croissance normal ou presque. Cette voie est dépendante de la voie de recombinaison médiée par *RAD52*, une composante centrale de la machinerie de recombinaison de l'ADN chez la levure (Lundblad et Blackburn, 1993, Teng et Zakian, 1999). Le fait de ramener les souches survivantes à un état télomérase-fonctionnelle résulte en un retour à la longueur et la structure de télomères de type sauvage (Lundblad et Blackburn, 1993, Teng et Zakian, 1999).

Il existe deux types de survivants. Les survivants de type I montrent une amplification des éléments Y' et possèdent de très courtes répétitions télomériques aux extrémités. Les survivants de type II montrent un patron variable de longues séquences répétées TG<sub>1-3</sub> et une amplification modeste des éléments Y' (Teng et Zakian, 1999). Des événements de conversion génique entre les séquences TG<sub>1-3</sub> terminales et internes amènent leur amplification, créant un réservoir de séquences internes pouvant être recombinées aux séquences terminales (Lundblad et Blackburn,

1993). Un élément Y' circulaire extrachromosomique peut aussi recombiner sur une séquence TG<sub>1-3</sub> très courte : dans des cellules de type sauvage, il est possible de retrouver quelques éléments Y' sur des plasmides circulaires se répliquant de façon autonome et qui peuvent recombiner à l'intérieur et à l'extérieur du chromosome (Horowitz et Haber, 1985). De plus, lorsque les télomères deviennent critiqueusement courts, les extrémités chromosomiques sont reconnues comme des bris d'ADN double-brin et sont liées par le complexe Rad50 (Furuse et al., 1998, Usui et al., 1998). L'hypothèse fut émise que les substrats pour la recombinaison de type II sont des éléments circulaires extrachromosomiques d'ADN TG<sub>1-3</sub> (Teng et al., 2000). Étant donné la nature répétitive de l'ADN télomérique, ces éléments télomériques circulaires pourraient être générés par une recombinaison intramoléculaire RAD50-dépendante. Si un complexe RAD50-télomère envahit un élément circulaire TG<sub>1-3</sub>, la réplication par cercle roulant (« rolling circle ») permettrait une augmentation rapide, large et variable de la longueur des télomères.

### **Effets de quelques mutations dans la matrice de *TLC1***

Des études dans plusieurs organismes ont montré que lorsqu'une matrice mutée d'ARN de la télomérase est introduite dans une cellule, la séquence modifiée peut être utilisée comme matrice et incorporée dans les télomères des cellules

(Autexier et Greider, 1995, Blasco et al., 1995, Feng et al., 1995, McEachern et Blackburn, 1995, Prescott et Blackburn, 1997a, Prescott et Blackburn, 1997b, Singer et Gottschling, 1994). En effet, une substitution de deux nt à l'intérieur de la matrice de *TLC1* (*S. cerevisiae*) est incorporée dans l'ADN télomérique, confirmant que ce domaine sert de matrice pour l'ajout de séquence télomérique (Singer et Gottschling, 1994). Une substitutions de trois bases (GUG) à l'intérieur du domaine matrice détruit l'activité télomérasique *in vivo* et *in vitro*, causant un raccourcissement progressif des télomères, une croissance lente et une éventuelle sénescence cellulaire (Prescott et Blackburn, 1997a, Prescott et Blackburn, 1997b).

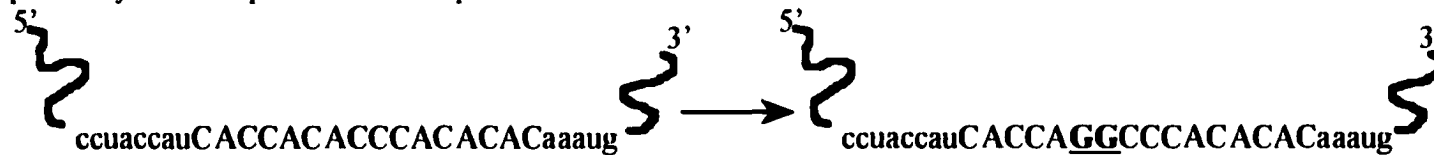
Après remplacement de la région matrice de 16 nt de TLC1 par la séquence matrice humaine (voir figure 3), les souches de levure ont la capacité d'ajouter des séquences télomériques humaines aux extrémités de leurs chromosomes. Leurs télomères sont toutefois plus courts (d'environ 100-200 pb). Ces souches sont viables, ne montrent aucun retard de croissance et expriment le gène « humanisé » à des niveaux comparables aux souches de type sauvage (Henning et al., 1998). Un faible niveau d'hybridation de la sonde télomérique de levure est possiblement dû à des séquences télomériques de levure résiduelles, qui semblent nécessaires au maintien de la stabilité des chromosomes. Le séquençage d'extrémités chromosomiques artificielles de levure a révélé parfois plus de 100 pb de séquences télomériques de

levure en amont de l'ADN télomérique humain ainsi que la présence de quatre résidus G devant les répétitions TTAGGG, pouvant être généré si les deux derniers C de la matrice ARN « ...CTAACCC... » s'apparient aux deux derniers G d'une répétition TG<sub>1-3</sub>.

Figure 3 : Différentes mutations dans la région de la matrice de l'ARN *TLC1*

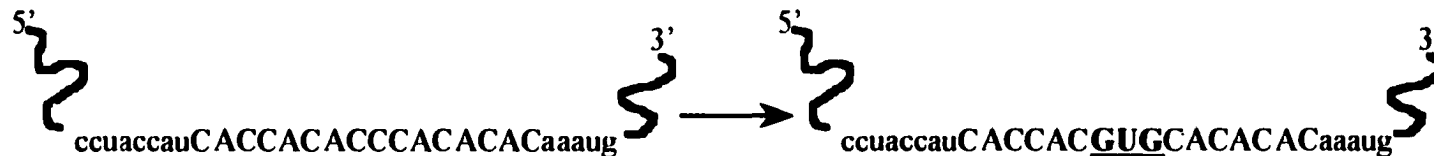
Singer et Gottschling, 1994 :

Une substitution de 2 nt dans la matrice amène des télomères courts et hétérogènes ; la séquence mutée est utilisée comme matrice pour l'ajout de séquence télomérique.



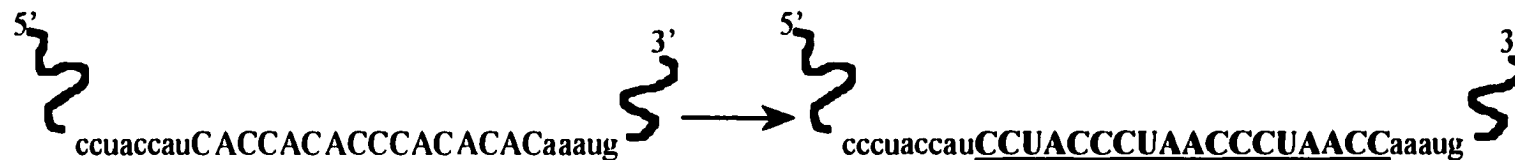
Prescott et Blackburn, 1997 :

Substitution de 3 bases GUG dans la région matrice : effets majeurs sur la fonction de l'enzyme : raccourcissement progressif des télomères, croissance lente et sénescence.



Henning et al, 1998 :

Remplacement complet de la région matrice de *TLC1* (16 b) par la matrice humaine : les cellules semblent normales, mais avec des répétitions télomériques humaines aux fins des chromosomes.



Mes travaux de recherche, basés sur cette dernière étude, ont porté sur la construction d'un modèle simple *in vivo* pour le fonctionnement des télomères humains. Nous avons voulu confirmer s'il était possible d'ajouter des séquences télomériques humaines aux extrémités de souches de levure utilisées au laboratoire. Par la suite, nous nous sommes questionné sur la présence de l'extension simple-brin ainsi que sur l'effet sur la transcription des gènes localisés près des télomères. L'analyse de ces souches à long terme a aussi été vérifiée afin de voir leur viabilité après plusieurs générations. Ce modèle *in vivo* nous a permis d'étudier les effets de la protéine UP1 sur les télomères. Enfin, une étude fut effectuée afin de vérifier si les sous-unités de la télomérase humaine pouvaient compléter les sous-unités de levure dans des souches portant des séquences télomériques terminales humaines.

## **2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **Préparations de plasmides et techniques de base**

Les techniques de mini-prep et de clonage, incluant les digestions par enzymes de restriction, la production d'extrémités franches par le fragment Klenow de l'ADN polymérase I (large fragment) ou la T4 DNA polymérase, les ligations, l'électrophorèse sur gel d'agarose, les « Southern blot », les extractions au phénol, phénol-chloroforme et au chloroforme, les précipitations à l'éthanol et les transformations plasmidiques furent réalisées selon les protocoles de laboratoire de Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989). Les enzymes utilisées proviennent des compagnies Amersham Pharmacia Biotech, Promega LIFE Science et New England Biolabs. La purification de bande d'ADN fut effectuée à l'aide de tubes Spin-X (Costar). Les techniques de Midiprep furent réalisées à l'aide des trousse Quiagen (Plasmid Midi Kit).

### **Constructions plasmidiques**

Les constructions plasmidiques les plus importantes sont illustrées à la figure 4. Le plasmide pTLC1HTRP (figure 4C) fut construit à partir d'un fragment de 1014



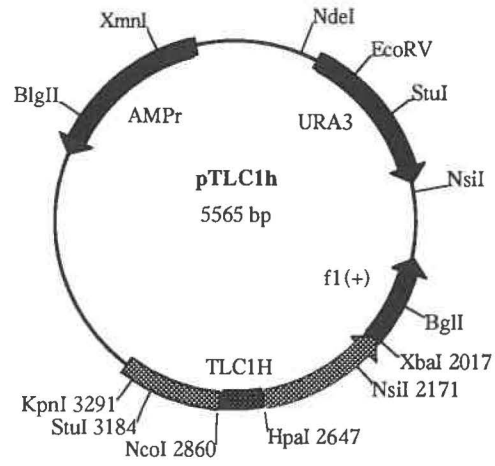
pb contenant le gène *TLC1* avec la séquence matrice de la télomérase humaine en digérant *StuI* et *NsiI* le plasmide pTLC1h (figure 4A) (Henning et al., 1998). Ce fragment fut ligué par la suite au fragment *StuI/NsiI* de 6687 pb du plasmide pTLC1TRP (figure 4B). Ce dernier correspond au fragment *NdeI/EcoRI/Klenow* de pAZ1 (2916 pb comprenant le gène *TLC1*) (Beeler et al., 1994) ligué au vecteur pRS314 linéarisé par *EcoRI* et traité à la Klenow (4785 pb). pTLC1HTRP comprend donc le marqueur de sélection *TRP1* et le gène *TLC1* avec la matrice humaine. Il est à noter que la construction du plasmide pTLC1HTRP fut vérifiée par hybridation dans un gel dénaturant (voir plus loin) à l'aide d'une sonde  $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$  puisque la taille de l'insert est identique au fragment enlevé.

Le plasmide servant à la délétion du gène *EST2* endogène, pEST2 $\Delta$ ::*HIS3* (figure 4D), fut construit à partir d'un fragment de 1980 pb (*SmaI* + *PvuII*) de pHIS3 (fragment *BamHI* de *HIS3* dans Ycplac33) inséré dans le site *HpaI* de pVZ1-EST2. pVZ1-EST2 est constitué du fragment génomique *BamHI* de *EST2* (4,4 kb provenant du plasmide pVL291, fourni par le laboratoire de Victoria Lundblad) inséré au site *BamHI* de pVZ1 (Henikoff et Eghtedarzadeh, 1987). Le plasmide pEST2-LYS2 (figure 4E) fut aussi construit en insérant le fragment *BamHI* (4,4 kb) de pVZ1-EST2, puis traité à la Klenow, dans le site *SmaI* de pRS317.

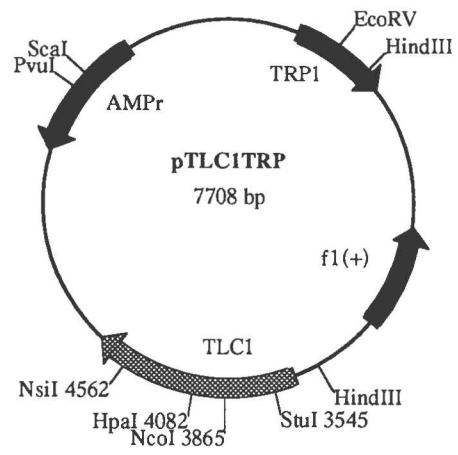
Les plasmides pEGKT-hTERT (figure 4F) et p413-hTR furent fournis par le laboratoire de Chantal Autexier. pEGKT-hTERT est formé d'un fragment de PCR de 3.4 kb de hTERT (XbaI/HindIII) ligué au vecteur pEGKT/XbaI+HindIII afin d'obtenir une fusion GST-hTERT. Le plasmide p413-hTR fut obtenu en insérant un fragment de PCR de hTR de 450 pb (BamHI) au site BamHI de p413-pGAL (5656 pb) afin d'obtenir une fusion avec  $P_{GAL}$  (Bachand et Autexier, 1999). Le plasmide pRS422-hTR (figure 4G) fut donc construit à l'aide du fragment SacI+XhoI de p413-hTR ligué au vecteur pRS422 digéré SacI+XhoI. Cette ligation a pour conséquence de conserver le promoteur inductible au galactose en fusion avec le gène *hTR*. Cependant, le gène de sélection *ADE2* est maintenant présent sur le plasmide.

Les plasmides d'expression pYES2-A1 et pYES2-UP1 (figures 4H et 4J) (créé par Catherine Lebel, laboratoire de Dr. Raymund Wellinger) furent construits à partir des fragments BamHI+EcoRI ( 1387 pb pour A1 et 600 pb pour UP1) de pGEX-A1 (fourni par le laboratoire du Dr. Benoît Chabot). Ces fragments furent ligués au plasmide pYES2 digéré par BamHI et EcoRI. Les plasmides pYES2-NLS-A1 et pYES2-NLS-UP1 (figures 4I et 4K) furent obtenus en insérant les oligonucléotides NLSA et NLSB préalablement hybridés au site BamHI des plasmides pYES2-A1 et pYES2-UP1. Ainsi, la séquence consensus de 7 a.a. (PKKKRKV) (Dingwall et Laskey, 1991) se retrouve en fusion avec les protéines A1/UP1.

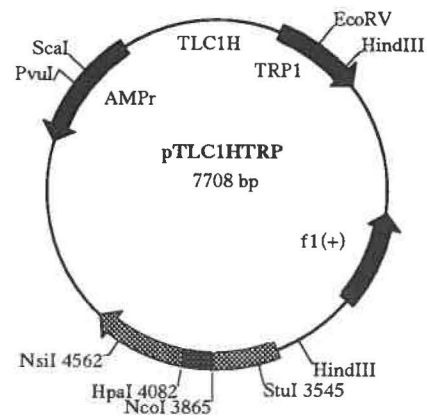
A.



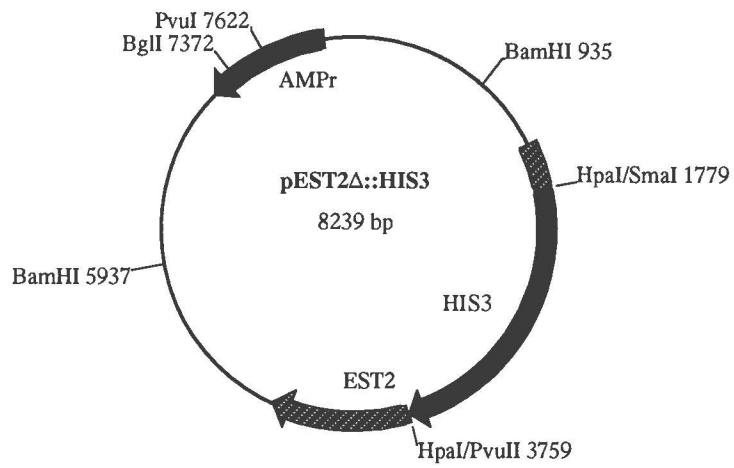
B.



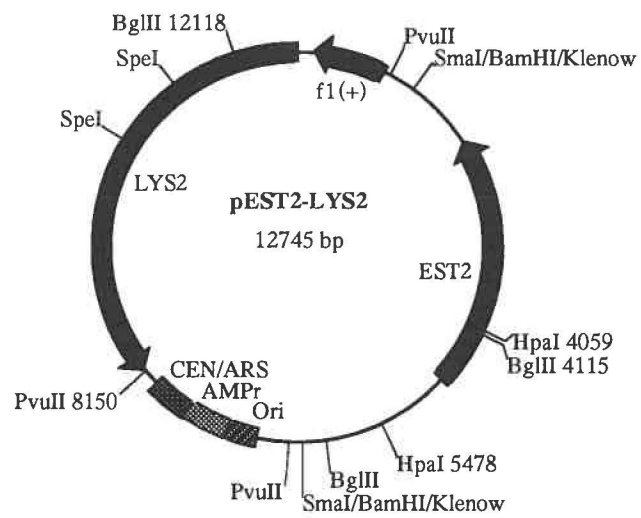
C.



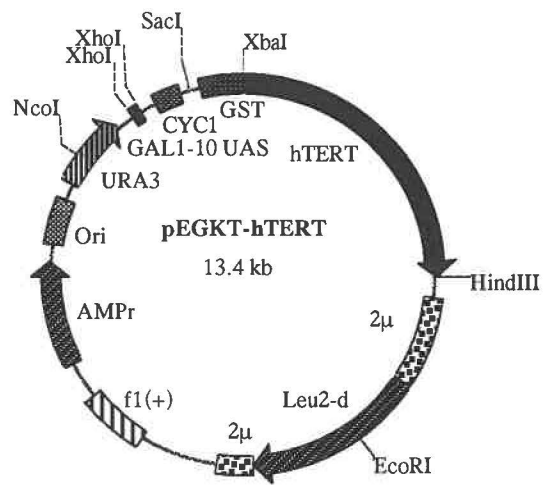
D.



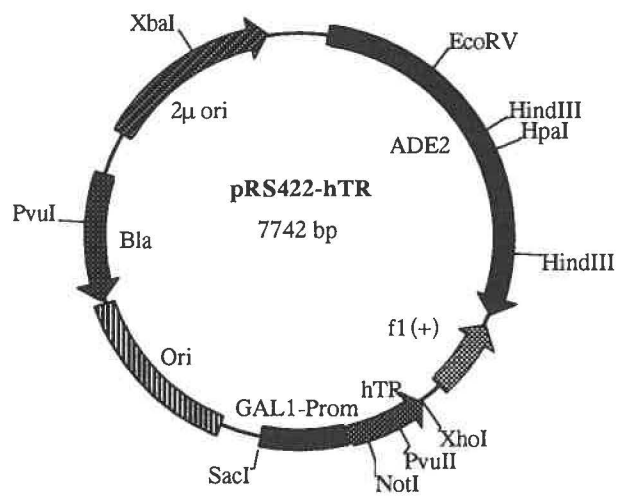
E.



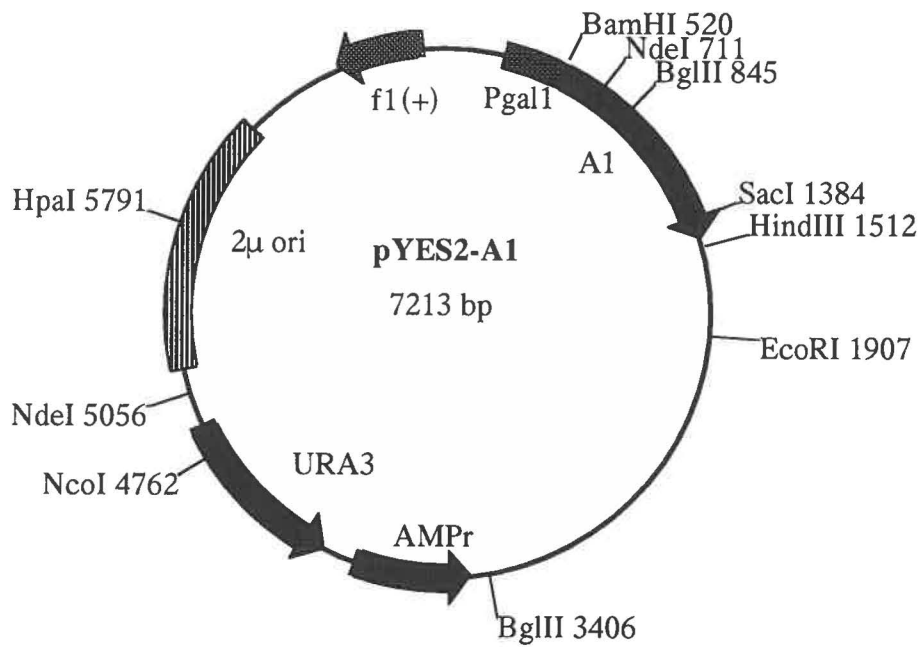
F.



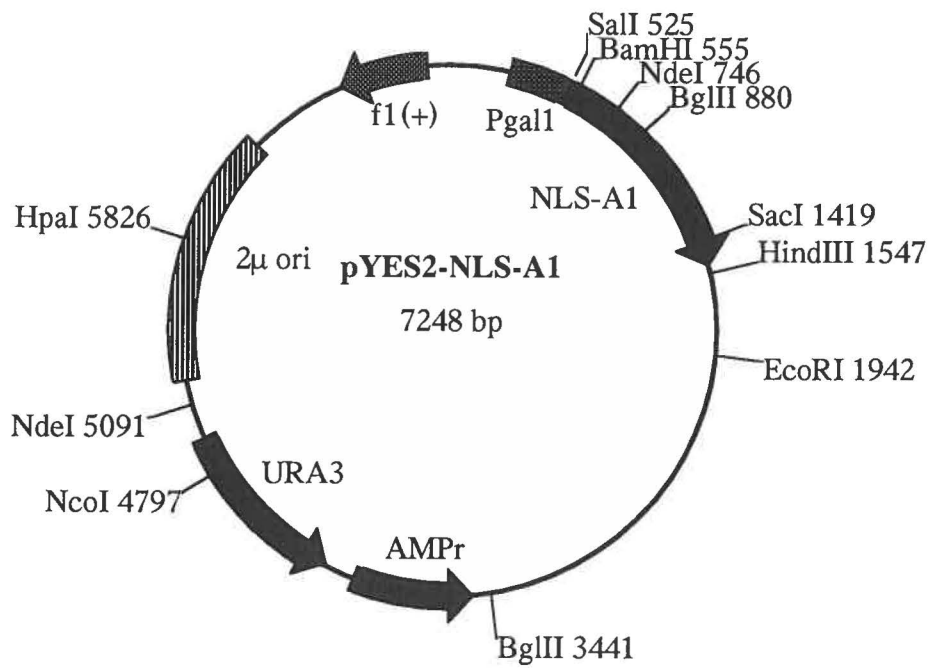
G.



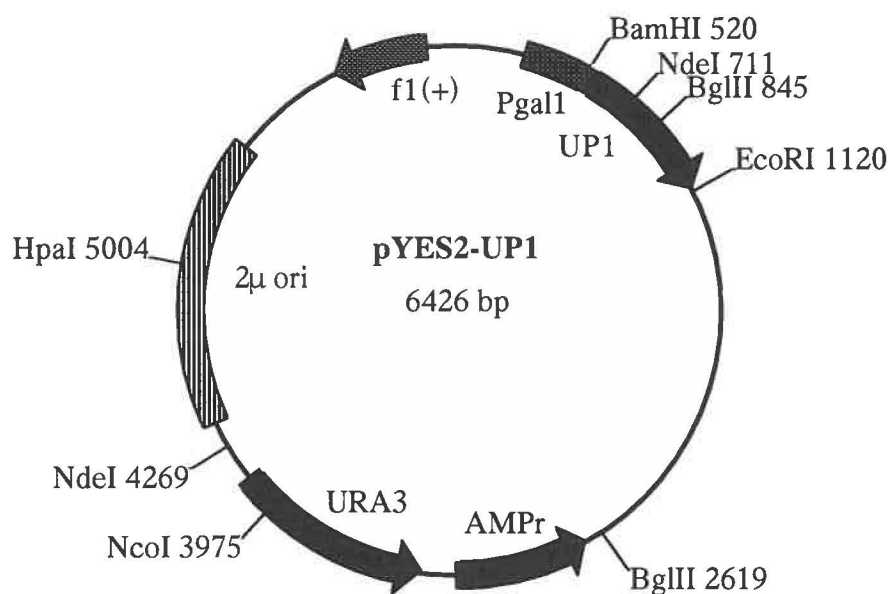
H.



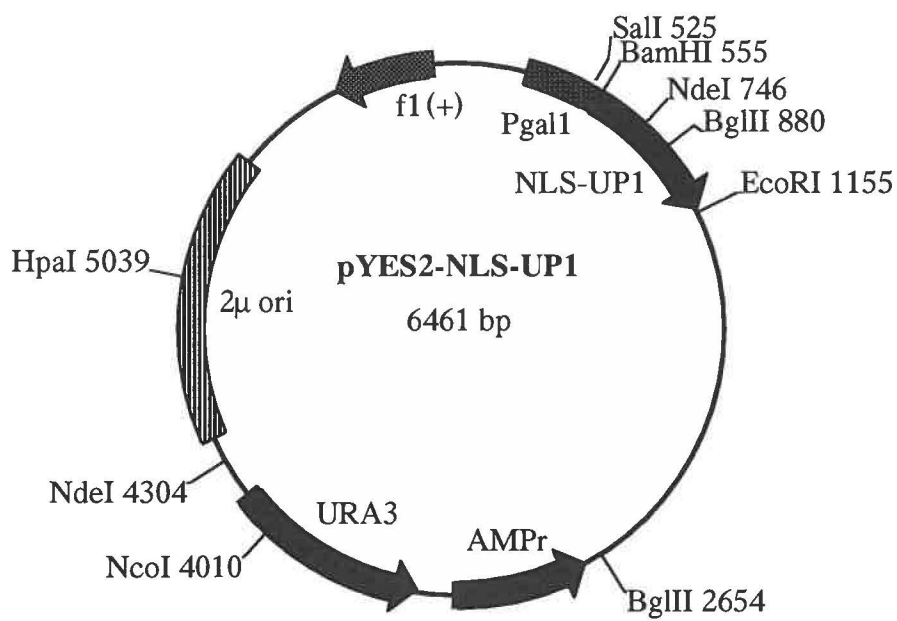
I.



J.



K.



**Figure 4. Constructions plasmidiques. A. pTLC1h. B. pTLC1TRP. C. pTLC1HTRP. D. pEST2Δ::HIS3. E. pEST2-LYS2. F. pEGKT-hTERT. G. pRS422-hTR. H. pYES2-A1. I. pYES2-NLS-A1. J. pYES2-UP1. K. pYES2-NLS-UP1. Voir Matériel et méthodes pour la description des clonages.**



## Délétions des gènes *EST2* et *TLC1*

La délétion du gène *TLC1* par *KanMx4* s'est effectuée par conversion génique à l'aide d'un produit de PCR comportant les 40 premiers et derniers nucléotides du gène *TLC1*, le restant étant remplacé par le gène *KanMx4* (Brachmann et al., 1998). La réaction de PCR s'est réalisée à l'aide de 1 ng du plasmide pRS400 (*KanMx4*) et 20 pmoles des amorces *TLC1*-FORWARD et *TLC1*-REVERSE et 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 53°C et 3 min à 72°C furent suivis de 15 min à 72°C. L'enzyme utilisée provient de Roche Diagnostics Corp. (FastStart Taq DNA Polymerase). 1 µg du produit de PCR fut transformé dans la souche BY4705. Les souches délétées par *KanMx4* sont sélectionnées sur un milieu contenant du G-418 200 ng/ul (Geneticin, GibcoBRL).

La délétion du gène *EST2* par *HIS3* fut réalisée par conversion génique. 1 µg du fragment *EcoRI*+*SphI* (5051 pb) du plasmide pEST2Δ::*HIS3* a été transformé dans les souches BY4705 *tlc1*Δ::*KanMx4*. Ce fragment possède 316 pb (au début) et 919 pb d'homologie avec le gène *EST2* permettant la délétion de celui-ci par le gène *HIS3*.

## Purification d'oligonucléotides

Trente  $\mu\text{g}$  d'oligonucléotide (en présence de trente  $\mu\text{l}$  de colorant formamide) sont bouillis 2 min et déposés sur gel 12% d'acrylamide :bisacrylamide (38:2)/7 M urée/20 % formamide. Le gel est pré-migré 15 minutes à 15 Watts et migré à ce même wattage. La bande correspondant à l'oligonucléotide est identifiée par « UV shadowing » sur plaque TLC et coupée du gel pour purification (Sambrook et al., 1989). La bande est ensuite écrasée et l'oligo élué de l'acrylamide par agitation pendant une heure à la température de la pièce en présence 400  $\mu\text{l}$  de NaOAc 0.3M/SDS 0.2%. L'oligo extrait du gel est alors centrifugé 10 min à 13000 rpm et récupéré du surnageant par précipitation à l'éthanol. Il est ensuite resuspendu dans 10  $\mu\text{l}$  de TE. La concentration d'ADN est dosée au spectrophotomètre à 260 nm.

### **Marquage d'oligonucléotides au $\gamma$ -ATP**

Le marquage par phosphorylation de l'extrémité 5' se fait à l'aide de la T4 polynucléotide kinase (Sambrook et al., 1989). L'oligonucléotide purifié (200 ng de C<sub>1-3</sub>A, 20 pmoles des oligos télomériques humains ou 5 pmoles de ts10) est incubé avec 5  $\mu\text{l}$  [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (NEN), 10 unités de polynucléotide kinase et du tampon kinase 1X (50 mM Tris-Cl pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0.1 mM spermidine et 0.1 mM EDTA pH 8.0) pendant 45 min à 37°C, puis 10 min à 68°C, dans un volume final

de 20 µl. Le produit marqué est alors purifié sur colonne G-50 Séphadex.

L'oligonucléotide marqué est ensuite utilisé directement pour l'hybridation.

### **Séquençage**

Le cadre de lecture des plasmides pYES2-A1, pYES2-UP1, pYES2-NLS-A1 et pYES2-NLS-UP1 fut déterminé par séquençage à l'aide de la trousse de séquençage T7 de Pharmacia Biotech et selon les instructions qui l'accompagnent. L'oligo FD-1 (séquence complémentaire au début de l'ADNc de A1) fut utilisé. Les séquences furent séparées sur gel de polyacrylamide 6%/8M urée et révélées par autoradiographie.

### **Culture, transformation de levure et sporulation et isolement des spores par microdissection**

Les levures sont transformées par LiAc selon la méthode à haute efficacité (Gietz et al., 1992) et croissent à 30°C dans des milieux standards de levure (YC) (Zakian et Scott, 1982) contenant 2% glucose, galactose ou raffinose, selon le cas. La sporulation et l'isolement des spores furent réalisés selon la méthode standard (Rose et al., 1990).

## **Extraction d'ADN génomique de levure**

L'ADN génomique de levure est isolé à l'aide de la méthode des billes de verre (Huberman et al., 1987, Wellinger et al., 1993b). Brièvement, cette méthode consiste à lyser les cellules à l'aide de billes de verre dans un tampon de lyse (0.1 M Tris, 50 mM EDTA, 1% SDS pH 8.0). Après avoir traité l'ADN à la RNase et à la protéinase K, on procède à une extraction au phénol-chloroforme et au chloroforme. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol et dosé sur gel d'agarose.

## **Gels de télomères et hybridation dans le gel**

Après digestion de l'ADN génomique avec l'enzyme XhoI, l'ADN est déposé sur gel 0,75% agarose (TBE) et les fragments sont séparés par électrophorèse pour 16 heures à 0,8 V/cm. Le gel est immergé pour 30 minutes dans 2XSSC (0.3 M NaCl/0.03 M citrate de sodium, pH 7) à température de la pièce et séché sous vide pendant environ 20 minutes à la température de la pièce à l'aide d'un système Bio-Rad. Le gel séché est ensuite hybridé environ 16 heures directement à l'aide d'une sonde radioactive ( $1-2 \times 10^6$  CPM) dans un tampon d'hybridation (5XSSC [750 mM NaCl, 75 mM citrate de sodium], 5XDenhardt [0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1%

BSA, 0.1% Ficoll] (Denhardt, 1966) et 0.1XP-wash [0.5 mM pyrophosphate, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ] (Counter et al., 1992). L'oligonucléotide marqué  $\text{C}_{1-3}\text{A}$  (22-mer) est utilisé pour détecter les séquences télomériques de levure les sondes télomériques humaines sont fabriquées à partir des oligo  $(\text{C}_3\text{TA}_2)_{3.5}$ . La température d'hybridation est de 37°C lorsque la sonde  $^{32}\text{P}(\text{C}_{1-3}\text{A})$  est utilisée et de 23°C lorsque les sondes  $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_{3.5}$  sont utilisées. Le gel est ensuite placé dans 0.25XSSC et lavé deux heures à la température de la pièce. Le gel est alors exposé sur film Kodak XAR-5 à -80°C pour une durée de 1-6 jours.

Cette technique d'hybridation dans un gel non-dénaturant permet la détection d'ADN simple-brin (Dionne et Wellinger, 1996, McElligott et Wellinger, 1997). Les gels peuvent ensuite être dénaturés avant d'être réhybridés afin d'observer l'ADN télomérique double-brin dénaturé. Le gel est alors trempé dans un tampon de dénaturation (150 mM NaCl et 0.5 M NaOH) pendant 25 minutes et il est ensuite placé dans une solution de neutralisation (150 mM NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 8.0) pour 20 minutes afin de permettre la réhybridation d'une sonde radioactive (Counter et al., 1992).

### **Induction de l'expression des protéines hnRNP A1/UP1**

La croissance des cellules transformées fut effectuée en milieu liquide 2% raffinose (milieu permettant la croissance des cellules mais n'induisant pas l'expression de protéine à partir de plasmide  $P_{GAL}$ ) pendant 16 heures. Les cellules sont ensuite lavées et poussées en milieu 2% glucose ou 2% galactose séparément ( $\sim 1,5 \times 10^7$  cellules/ml), afin de réprimer ou d'induire l'expression des protéines sous  $P_{GAL}$ . Une partie de la culture en galactose est utilisée pour inoculer un second milieu contenant du galactose afin de maintenir plus longtemps l'induction ( $\sim 1,5 \times 10^7$  cellules/ml) (~ un jour de plus).

### **Préparation d'extraits cellulaires de levure (protéines)**

Les extraits protéiques totaux de levure furent obtenus selon la méthode utilisée par Berman et al. (Berman et al., 1986). En bref, les cellules sont suspendues dans un tampon A (50 mM KCl, 50 mM Hepes pH 7.5, 5 mM EDTA, 5% vol/vol glycérol) et brisées à l'aide de billes de verre. Les débris cellulaires sont enlevés par centrifugation. Le surnageant (conservé à  $-70^{\circ}\text{C}$ ) est ensuite analysé par immunobuvardage ou gel de retardement.

### **Immunobuvardage**

Les extraits protéiques furent séparés par SDS-PAGE (Sambrook et al., 1989) sur gel de polyacrylamide 29 :1 et transférés électrophorétiquement à 80 V pour 1.5 heures à 4°C sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (Amersham LIFE Science). La membrane est rincée au TBS (Tris-buffered saline : 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl) et bloquée 16 heures à 4°C dans du TBST (TBS + 0.1% Tween 20), 5% lait en poudre. La membrane est ensuite incubée une heure à la température de la pièce sous légère agitation avec l'anticorps anti-A1/UP1 purifié (discuté plus loin) dilué 1:1000 dans du TBST-lait (0.036 ml de tampon par cm<sup>2</sup> de membrane). Après deux lavages de 15 minutes au TBST, la membrane est mise en contact avec un Ig anti-lapin couplé à la peroxidase de raifort (Amersham Life Science) dilué 1:5000 dans du TBST-lait (0.036 ml de tampon par cm<sup>2</sup> de membrane) pendant 1 heure à la température de la pièce sous légère agitation. La membrane est ensuite lavée et les protéines détectées par chimioluminescence avec le système de détection ECL d'Amersham.

### **Anticorps**

L'anticorps anti-A1/UP1 purifié provient du laboratoire de Dr. Benoît Chabot. Un peptide commun à hnRNP A1/UP1 fut synthétisé et injecté dans des lapins par le Service de Séquence de Peptides de l'Est du Québec. Le sérum complet d'une

troisième saignée fut purifié par FPLC. Comme l'anticorps non-purifié reconnaît plusieurs autres protéines dans un extrait total de levure (les lapins ayant probablement été en contact avec des levures), l'utilisation de l'anticorps purifié était nécessaire.

### **Gels de retardements**

Les essais de liaison des protéines UP1 et NLS-UP1 aux séquences télomériques furent effectuées dans un volume de 20 µl d'une solution contenant 75 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3% Ficoll, 2.5 µg/µl d'héparine, 0.1 mM EDTA, 10 mM Hepes pH 7.8 et 1 mM DTT. L'oligonucléotide TS10 marqué à l'extrémités 5' est incubé 30 minutes à la température de la pièce avec les différents extraits protéiques. Trois µl de tampon de migration sont ajoutés avant de faire migrer le tout sur un gel natif 6% acrylamide dans 1XTBE, à 200 V pendant 90 min. Le gel est ensuite exposé sur film Kodak XAR5 à -80°C.

Lors d'ajout d'anticorps, ce dernier est ajouté après 15 minutes de la première réaction. Le nouveau mélange est incubé à la température de la pièce pour 25 minutes supplémentaires et déposé sur un gel natif 6 % acrylamide dans 1XTBE pré-migré 1



heure à 100 V. Le gel est ensuite migré à 110 V pendant 4 heures et exposé sur film Kodak XAR-5 à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Oligonucléotides**

$(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$  : CCCTAACCCTAACCCTAA

$(\text{C}_3\text{TA}_2)_4$  : CCCTAACCCTAACCCTAACCCTAA

$(\text{C}_3\text{TA}_2)_5$  : CCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAA

$\text{C}_{1.3}\text{A}$  : CCCACCACACACCCACACCC

FD-1 : TCAGACTCTCGTCGGTTGTT

NLSA : GATCGTCGACATGCCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAG

NLSB : GATCCTACCTTTCTCTTCTTTTTGGGCATGTTCGAC

TLC1-FORWARD : AATAAACTAGAGAGGAAGATAGGTACCCTATGAAA-  
ATGTAGATTGTACTGAGAGTGCAC

TLC1-REVERSE : TAAATATTAAGAGGGCATACCTCCGCCTATCCGCCTAT-  
CCTCTGTGCGGTATTTACACACCG

ts10 : (TTAGGG)<sub>10</sub>

### 3. RÉSULTATS

#### **Construction d'une souche de levure avec des séquences télomériques humaines**

Les études de Henning et al. ont montré que des levures portant des séquences télomériques terminales humaines étaient parfaitement viables malgré leurs télomères raccourcis (Henning et al., 1998). Ces résultats surprenants nous ont poussé à vérifier si ceux-ci étaient reproductibles dans les souches utilisées dans notre laboratoire.

#### **a. Vérification de la présence de séquences télomériques humaines à l'extrémité des chromosomes de levure**

La souche RWY12 (*MATa*, *ura3-52*, *lys 2-801*, *ade2-101*, *trp1-Δ1*, *his3-Δ200*, *leu2-Δ1*, *DIA5-1*, *tlc1Δ::LEU2*, pAZ1 (*TLC1*, *URA3*)) (Dionne et Wellinger, 1996, Wellinger et al., 1996) fut utilisée comme souche de départ. Le plasmide pAZ1 (*TLC1*, *URA3*) qu'elle contient est nécessaire pour sa survie puisqu'elle possède une délétion du gène *TLC1* (remplacé par *LEU2*). Les plasmides pTLC1HTRP (matrice humaine) et pTLC1TRP (matrice de levure) furent transformés, en parallèle, dans cette souche. Il est à noter que la seule différence entre ces deux plasmides est le 18 pb de la matrice ARN. Par la suite, une contre-sélection sur 5-FOA a permis de

sélectionner les cellules ayant perdu pAZ1. Les cellules portant le gène *URA3* convertissent le 5-FOA en un intermédiaire toxique, alors que la perte d'*URA3* empêche cet événement (Boeke et al., 1984). Les souches TLC1H (contenant le plasmide pTLC1HTRP) et les souches TLC1WT (contenant le plasmide pTLC1TRP) n'ont d'autres choix que d'utiliser la séquence matrice d'ARN de télomérase disponible sur les plasmides qu'elles contiennent. Ces cellules ont réellement perdu le plasmide pAZ1 puisqu'elles ne poussent pas sur un milieu sans uracile. De plus, la souche de départ RWY12 est réellement *tlc1Δ*, puisqu'on observe un phénotype de sénescence à 80 générations après la perte de pAZ1 (données non montrées). Ces derniers résultats sont en accord avec la littérature (Singer et Gottschling, 1994).

Une méthode fréquemment utilisée pour vérifier la survie est le restriage de cellules de levure. Des cellules de levure peuvent être striées sur milieu solide où elles forment des colonies après 3-4 jours. Une colonie d'environ 2 mm de diamètre contient  $10^6$  cellules, ce qui correspond à environ 20 générations. Cette colonie peut être piquée et restriée sur un autre milieu solide, et ainsi de suite (figure 5). L'avantage à faire croître les levures en milieu solide est qu'on peut facilement observer l'apparition de survivants par rapport au milieu liquide. Ceux-ci se caractérisent par une croissance plus rapide (colonies plus grosses que les cellules en sénescence).

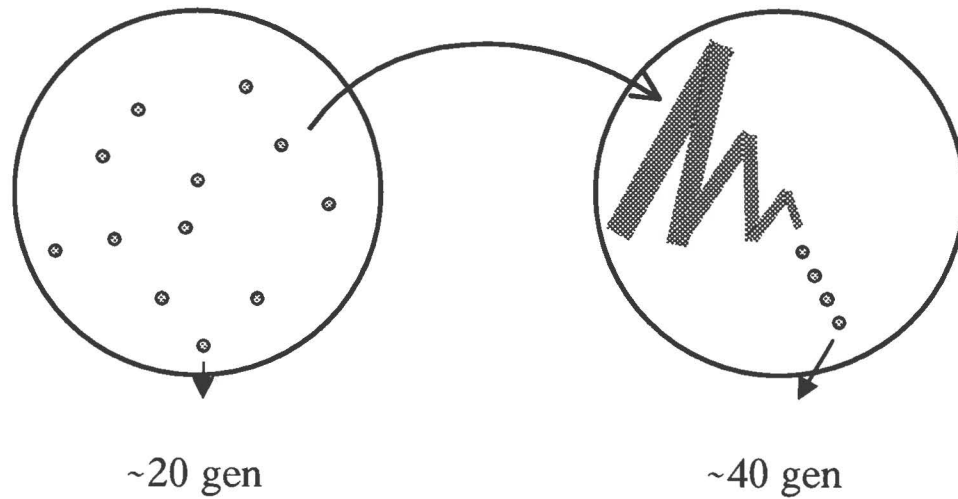


Figure 5 : Méthode de restriage de cellules de levure. Des cellules de levure poussée sur milieu solide forment des colonies. Lorsque celles-ci ont un diamètre d'environ deux mm, elles contiennent environ  $10^6$  cellules, ce qui correspond à environ 20 générations. Une colonie peut être piquée et restriée sur un second milieu solide, et ainsi de suite.

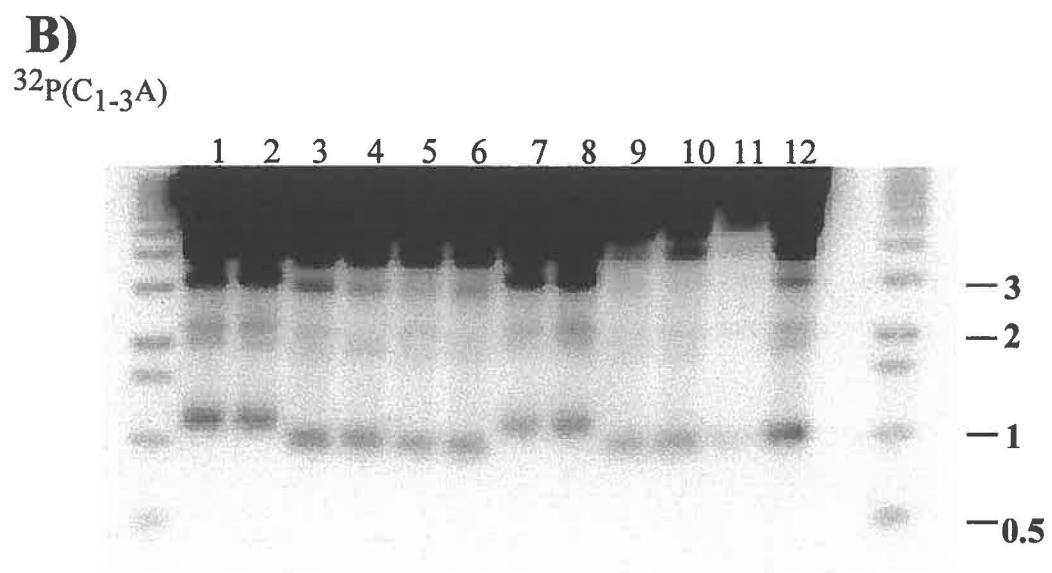
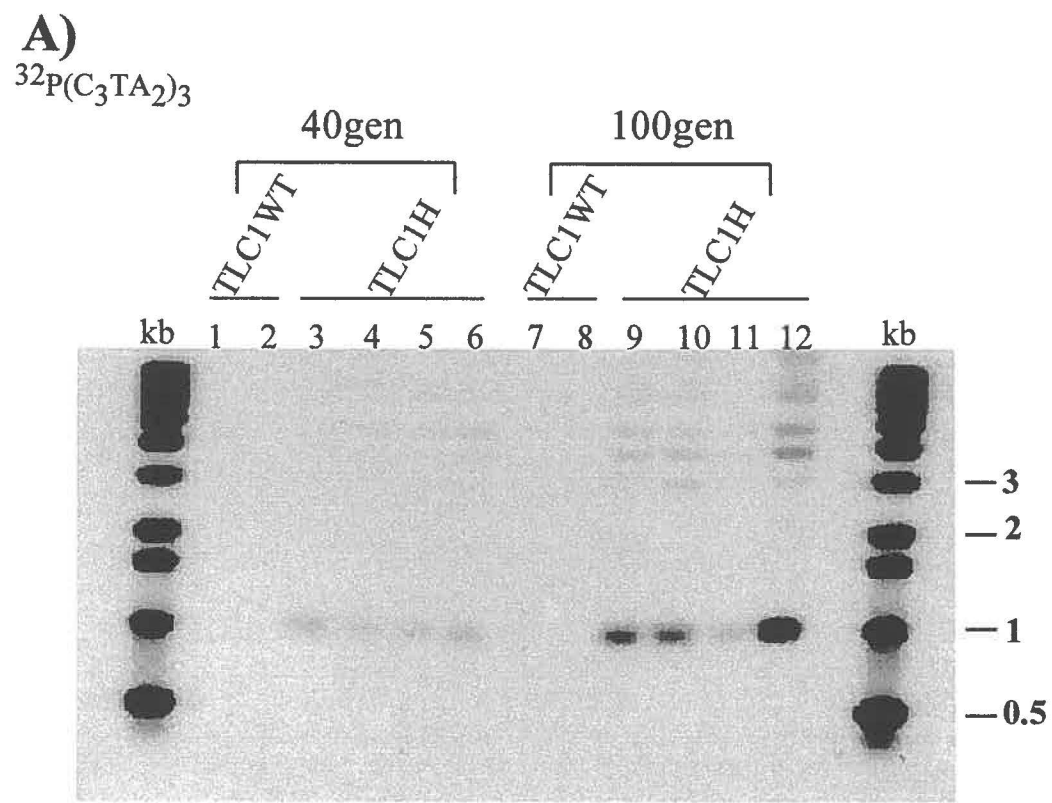
Après la perte du plasmide pAZ1, trois colonies des souches contenant la matrice humaine (TLC1H) et deux colonies des souches contenant la matrice de levure (TLC1WT) furent striées sur milieu sélectif (YC-TRP-LEU) afin de vérifier leur survie. Ainsi, les colonies furent striées pour 150 générations (~20 gen/strie) sans aucun phénotype de sénescence. Cette observation suggère que les souches avec une matrice ARN humaine possèdent la même capacité de croissance que des cellules de type sauvage et ce, pour au moins 150 générations.

Par la suite, on a voulu savoir si la télomérase contenant la matrice humaine était responsable de la survie de ces souches grâce à l'ajout de séquences télomériques humaines aux extrémités des chromosomes. Pour ce faire, la technique d'hybridation dans le gel fut utilisée (Dionne et Wellinger, 1996). Puisqu'on se trouve en condition non-dénaturante, cette méthode nous permet d'observer l'ADN simple-brin aux télomères. L'ADN génomique des souches à 40 et 100 générations fut extrait (2 clones TLC1WT et 4 clones TLC1H) et traité avec l'enzyme XhoI afin d'analyser les télomères. Les échantillons furent ensuite déposés sur gel d'électrophorèse. XhoI coupe une fois dans les éléments Y' et donne des bandes télomériques caractéristiques. Les bandes contenant des éléments Y' représentent l'ADN d'environ le 2/3 des télomères (Louis et Haber, 1990), contrairement aux bandes ne contenant pas de Y' (correspondant à un seul télomère). La majorité des chromosomes de levure

(de classe Y') possèdent un site XhoI à ~1,3 kb de l'extrémité, visualisé comme une bande hétérogène à ~1,3 kb avec la sonde télomérique de levure. Ainsi, la longueur des télomères est généralement mesurée comme la taille moyenne des fragments de restrictions terminaux (TRFs), libérés par l'enzyme XhoI.

Le gel non-dénaturant fut tout d'abord hybridé avec une sonde télomérique humaine (figure 6A) pour être ensuite dénaturé et réhybridé avec une sonde télomérique de levure (figure 6B). Sur gel non-dénaturant (figure 6A), on remarque que la présence de simple-brin télomérique humain dans les souches TLC1H est plus élevée à 100 gen (pistes 9-12) qu'à 40 gen (pistes 3-6) et que le signal est absent dans la souche TLC1WT (pistes 1-2 et 7-8). Le gel dénaturant hybridé avec une sonde télomérique de levure permet de comparer la quantité d'ADN dans chaque piste (figure 6B). On constate que les TRFs avec des séquences humaines sont plus courts (~1 kb) que les TRFs avec des séquences de levure (~1,3 kb) et ce, d'environ 300 pb, ce qui corrèle avec les résultats obtenus par Henning et al. (Henning et al., 1998). Cependant, la longueur des télomères semble stabilisée à 100 gen puisque la bande observée reste à 1 kb. Ces résultats suggèrent que les souches contenant la matrice humaine sont en mesure d'utiliser cette matrice pour leur survie. L'ajout des séquences télomériques humaines à l'extrémité de leurs chromosomes se ferait à un niveau suffisant pour le maintien d'une longueur critique (TRFs de 1 kb). Ces

**résultats nous ont poussé à vouloir connaître la longueur de l'extension simple-brin  
comprenant les séquences télomériques humaines.**





**Figure 6. Vérification de la présence de séquences télomériques humaines aux extrémités des chromosomes de levure. L'extraction de l'ADN génomique des souches TLC1WT (matrice de levure) et TLC1H (matrice humaine) après 40 et 100 gen est suivie d'une digestion par XhoI. A. La technique d'hybridation de gel d'agarose (0,75% TBE) séché non-dénaturant est utilisée en employant une sonde  $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$  ( $10^6$  CPM). B. Ce même gel est dénaturé puis hybridé avec une sonde  $^{32}\text{P}(\text{C}_{1-3}\text{A})$  (22-mer) ( $10^6$  CPM). Pistes 1 et 2 : 2 clones de la souche TLC1WT à 40 gen. Pistes 3 à 6 : 4 clones de la souche TLC1H à 40 gen. Pistes 7 et 8 : 2 clones de la souche TLC1WT à 100 gen. Pistes 9 à 12 : 4 clones de la souche TLC1H à 100 gen. kb : échelle de poids moléculaire de 1 kb.**

**b. Analyse de l'extension 3' terminale des souches contenant une matrice humaine**

Afin d'estimer la taille de l'extension 3' simple-brin  $(T_2AG_3)_n$  dans les souches contenant une matrice humaine, nous avons utilisé la technique d'hybridation dans le gel non-dénaturant avec des sondes télomériques humaines de différentes longueurs :  $^{32}P(C_3TA_2)_{3.6}$  (figure 7). La propriété d'hybridation des oligonucléotides est la base de cette expérience. Ainsi, les gels d'agarose non-dénaturants hybridés à un oligonucléotide radioactif sont lavés à des températures croissantes. Un oligonucléotide peut rester hybridé à son ADN complémentaire jusqu'à son  $T_m - 5^\circ C$ , le  $T_m$  étant la température à laquelle un duplexe ADN-ADN se dissocie dans une solution contenant une concentration précise de sodium (Baldino et al., 1989, McElligott et Wellinger, 1997). Ainsi, un oligonucléotide reste hybridé sur de longues extensions simple-brin jusqu'à une température correspondant au  $T_m - 5^\circ C$  (figure 7B). Cependant, lorsque l'oligonucléotide est plus long que l'extension simple-brin disponible (figure 7A), il se dissocie à une température inférieure à son  $T_m - 5^\circ C$ .

Ainsi, trois gels contenant l'ADN génomique des souches TLC1H à 100 gen furent hybridés séparément avec trois sondes contenant de trois à cinq répétitions télomériques humaines (figure 6). On remarque que le gel hybridé avec la sonde de

trois répétitions télomériques humaines (A) ne montre aucun signal pour la souche TLC1WT (piste 2) et que la sonde hybride l'ADN de la souche TLC1H (piste 3) ainsi que les contrôles simple-brin (pistes 4 et 5) à 30°C (figure 8A). Lorsque la température de lavage est augmentée à 48°C, la sonde se dissocie à la même température pour la souche TLC1H et les contrôles. L'expérience réalisée avec la sonde  $(C_3TA_2)_4$  (B) démontre les mêmes résultats pour la température de lavage à 30°C. À 48°C, le long contrôle positif (piste 4) ainsi que l'ADN de la souche TLC1H (piste 3) restent hybridés. Cependant, comme la sonde est plus longue que le contrôle comprenant ~ 3 répétitions télomériques humaines (piste 5), celle-ci se dissocie. De plus, tout est dissocié à 55°C. Finalement, lorsque la sonde  $(C_3TA_2)_5$  est utilisée (figure 8C), on observe que TLC1H (piste 3) et les deux contrôles simple-brin hybrident à 30°C (pistes 4 et 5). À 48°C et 55°C, les pistes 3 et 4 montrent un signal alors qu'à 60°C, aucun signal n'est détecté. Les oligos utilisés demeurent appariés à l'ADN simple-brin selon leur  $T_m$ -5°C respectif :  $(C_3TA_2)_3$  : 40.8°C ;  $(C_3TA_2)_4$  : 50.2°C ;  $(C_3TA_2)_5$  : 55.8°C (Baldino et al., 1989, McElligott et Wellinger, 1997). Puisque la sonde formée de cinq répétitions quitte les répétitions télomériques de la souche TLC1H et le contrôle positif au même moment, on peut estimer que l'extension 3' simple-brin des télomères est d'au moins trente bases (cinq répétitions de 6 nt).

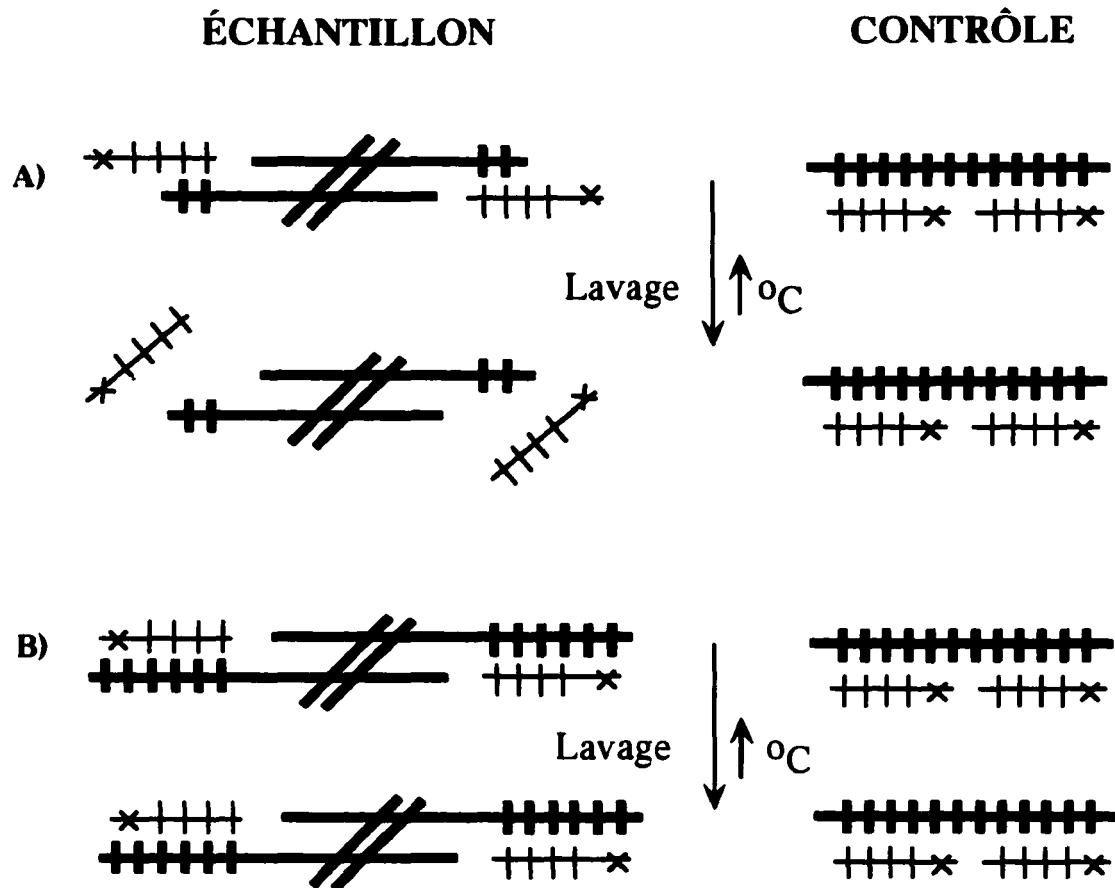
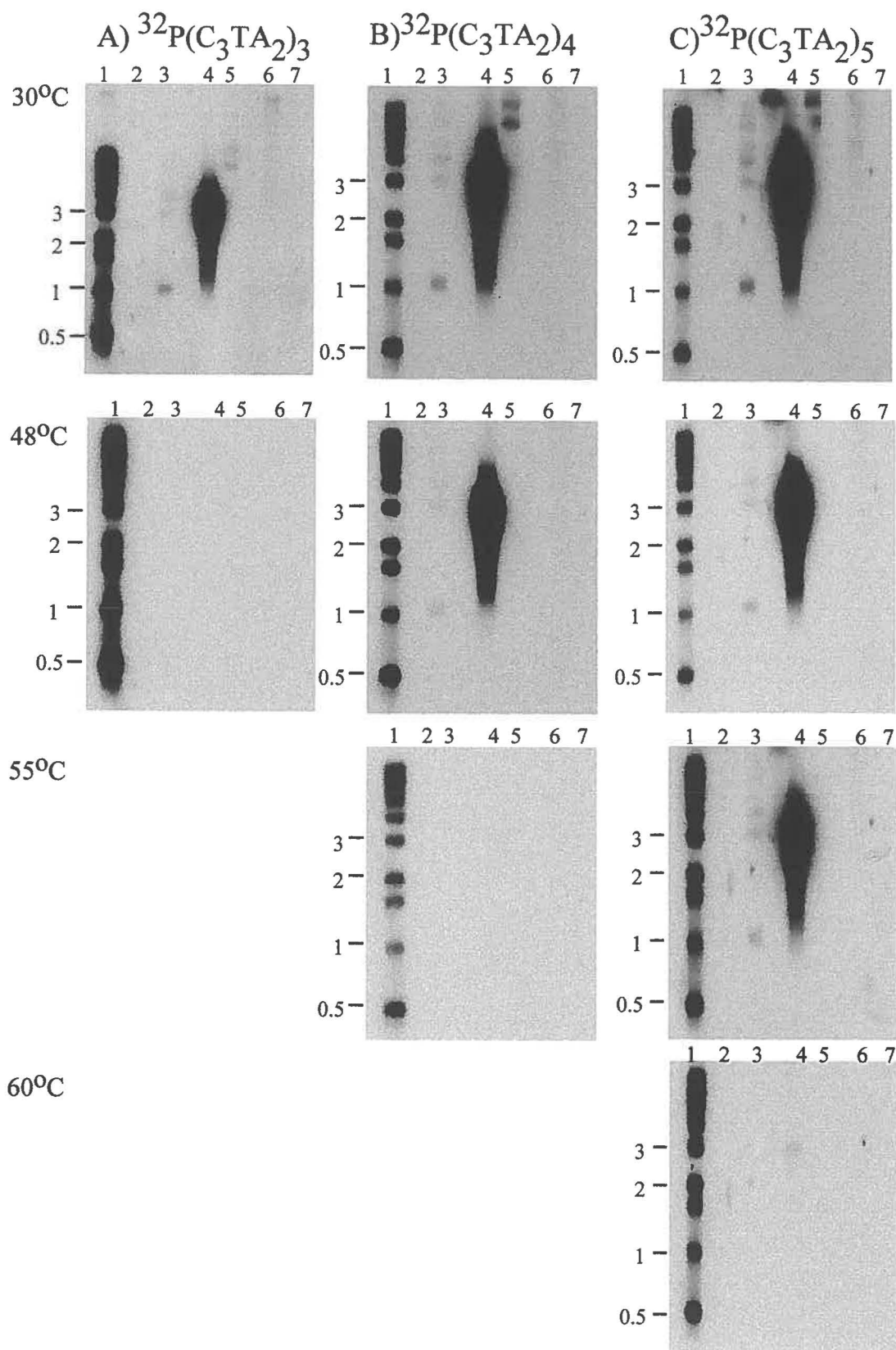


Figure 7. Technique pour estimer la taille d'une extension simple-brin. L'hybridation dans le gel non-dénaturant se fait à l'aide de sondes télomériques de différentes longueurs. Par la suite, les lavages se font à des températures croissantes. Ainsi, lorsque la sonde est plus longue que l'extension simple-brin disponible, elle se dissocie plus tôt que le contrôle positif (longues répétitions télomériques simple-brin) lors des lavages à une même température (A). Inversement, lorsque la sonde est plus courte ou de la même longueur que l'extension simple-brin, elle reste associée de la même façon que le contrôle positif et se dissocie à la même température que ce contrôle (B).



**Figure 8. Estimation de la taille de l'extension 3' terminale des souches contenant une matrice humaine. L'ADN génomique des souches à 100 gen est digéré avec XhoI, puis déposé sur quatre gels d'agarose 0,75% en parallèle. Ces gels sont séchés et hybridés séparément avec des sondes télomériques humaines de différentes longueurs ( $10^6$  CPM) **A.** Sonde  $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$ . **B.** Sonde  $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_4$ . **C.** Sonde  $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_5$ . Chaque gel est ensuite lavé deux heures dans 0.25XSSC à des températures croissantes : 30°C, 48°C, 55°C et 60°C. Piste 1 : échelle de poids moléculaire de 1 kb. Piste 2 : souche TLC1WT à 100 gen. Piste 3 : Souche TLC1H à 100 gen. Piste 4 : 1 ng du plasmide p16R linéarisé avec BglII et dénaturé en chauffant 10 minutes à 100°C (contient un fragment d'environ 1,6 kb comprenant deux blocs d'environ 800 pb de répétitions télomériques humaines). Piste 5 : 5 ng de pTLC1HTRP dénaturé (~3 unités de répétitions télomériques humaines simple-brin). Pistes 6 et 7 : contrôles correspondant aux pistes 4 et 5 mais non-dénaturé.**

### c. Vérification du TPE dans les souches contenant une matrice humaine

La présence de TPE (telomeric position effect) fut vérifiée afin d'analyser la structure terminale des télomères dans la souche TLC1H. Expérimentalement, les gènes *ADE2* ou *URA3*, respectivement requis pour la biosynthèse de l'adénine et de l'uracile, sont fréquemment placés adjacents au télomère d'un chromosome. Il est donc possible de mesurer approximativement la répression : plus le gène est actif et moins il y a de TPE. Puisque la souche de départ (RWY12) possède le gène *ADE2* près du télomère du bras droit du chromosome V, il est facile d'observer le TPE : sur un milieu contenant une faible concentration en adénine (10 mg/L), les colonies exprimant le gène *ADE2* sont blanches, alors que celles qui ne l'expriment pas (*ade2*) sont rouges (Gottschling et al., 1990). Normalement, les gènes près des télomères d'une souche de type sauvage sont fortement réprimés. Après l'étalement de cellules sur milieu sélectif, la proportion de colonies rouges fut déterminée : les souches TLC1H (40 et 100 gen) montrent une légère diminution du TPE (~55,6% pour le 40 gen et ~ 65,8 % pour le 100 gen) par rapport aux souches normales (~93,8%) (tableau 3). Elles ont toutefois un niveau plus élevé que des souches *sir4Δ* (gène essentiel au TPE) (Cockell et al., 1995, Marshall et al., 1987, Renauld et al., 1993). Ces résultats suggèrent une légère augmentation de la transcription du gène *ADE2*, ce qui

correspondrait à une diminution du TPE dû à la présence des répétitions télomériques humaines.



Souche	% TPE
TLC1WT à 40 générations	93,8 ± 1,8
TLC1H à 40 générations	55,6 ± 8,9
TLC1H à 100 générations	65,8 ± 1,1
<i>sir4Δ</i>	< 0,0001

Tableau 3. Vérification de la présence de TPE. 100, 300 et 500 cellules des souches TLC1WT à 40 générations et TLC1H à 40 et 100 générations furent étalées sur milieu sélectif (YC-TRP-LEU, low ADE). La proportion de colonies rouges et blanches est déterminée et comparée pour ces souches. Étant donné la nature semi-stable du TPE de plusieurs gènes, un changement entre les états transcriptionnellement actifs et silencieux peut avoir lieu aux quelques générations et ainsi amener différentes populations phénotypiques, notées par des secteurs rouges et blancs à l'intérieur d'une même colonie (Gottschling et al., 1990). Les colonies sectorées sont donc comptées comme des rouges. Les valeurs correspondent à la moyenne de deux clones testés et à l'écart-type par rapport à la moyenne. Les données pour la souche *sir4Δ* proviennent de la littérature (Pryde et Louis, 1999, Aparicio et al., 1991, Marshall et al., 1987).

#### **d. Survie à long terme des levures avec des séquences télomériques terminales humaines**

Puisque les phénotypes de sénescence dus à un défaut de réplication des télomères surviennent normalement après 80 gen (Lowell et Pillus, 1998), nous avons tout d'abord testé la survie des cellules pour 150 gen. Cependant, intrigués par la survie à long terme de ces cellules, nous avons continué à strier deux clones des souches TLC1WT et trois clones des souches TLC1H (figure 9). Les levures semblaient « en santé » jusqu'à ce qu'à 580 gen, un des clones TLC1H (c) meurt. Les deux autres clones TLC1H (a et b) semblaient normaux (figure 9B). Nous avons continué de tester la viabilité de ces deux derniers clones (a et b) et c'est à 1000 gen que le clone TLC1Hb a sénescé (figure 9C). Ainsi, deux clones TLC1H sont morts à différentes générations, alors que les clones TLC1WT et TLC1Ha semblent en santé. Il semble donc que la présence de séquences télomériques humaines sur des chromosomes de levure mène à la sénescence (pour deux des trois clones), bien que le moment d'apparition de la sénescence semble retardé par rapport à une délétion de *TLC1* (Singer et Gottschling, 1994).

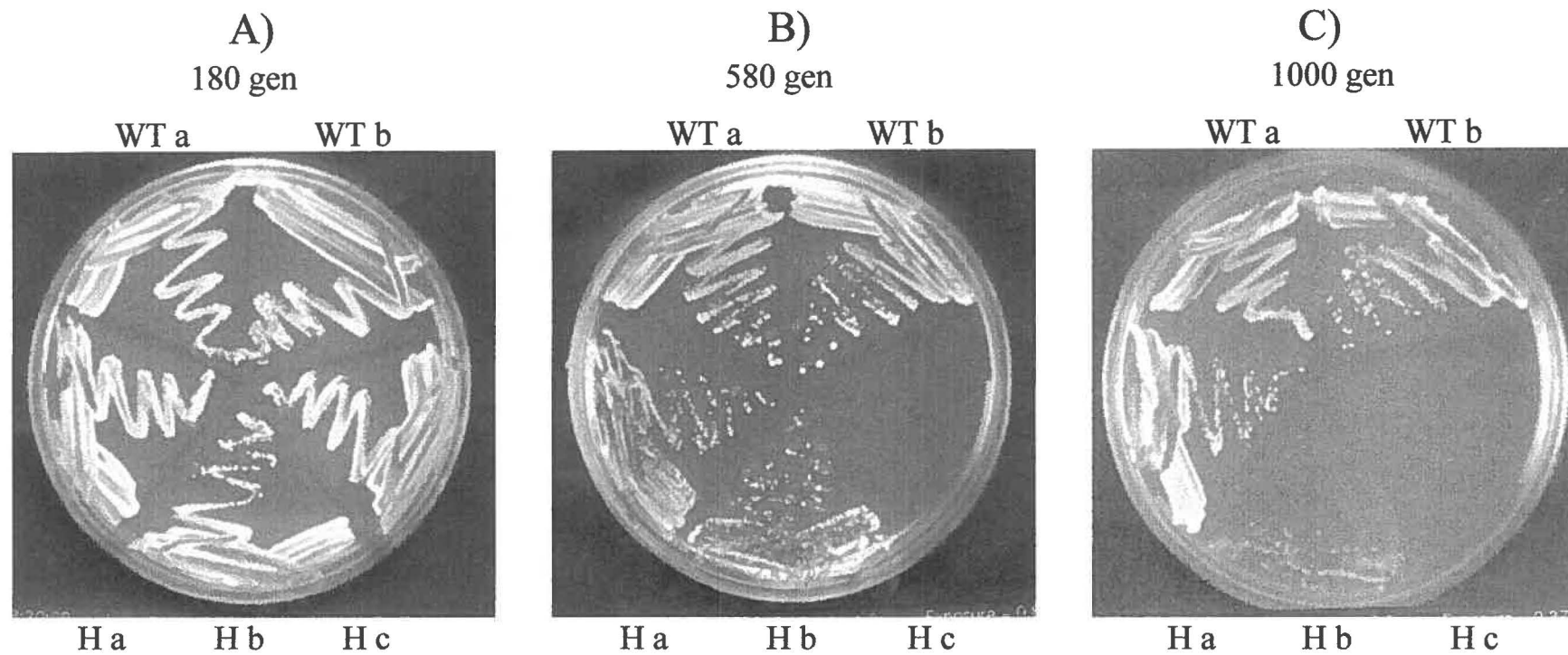


Figure 9. Survie à long terme des levures avec des séquences télomériques terminales humaines. Deux clones de la souche TLC1WT (a et b) et trois de la souche TLC1H (a, b et c) furent striées pour plusieurs générations sur milieu YC-TRP-LEU. Chaque colonie équivaut à environ 20 générations. À chaque 60 générations, la congélation de cellules et l'extraction d'ADN génomique fut réalisée. Les différentes souches sont montrées à 180 gen (A.), 580 gen. (B.) et 1000 gen. (C.).

Nous avons voulu comprendre si ces événements de sénescence étaient associés à un phénomène survenant aux télomères. Ainsi, les cellules furent restreintes à partir des cellules congelées à 450 et 930 gen et jusqu'à 590 et 1070 gen (pour TLC1Hc et TLC1Hb respectivement). Les souches étaient maintenant en mesure de croître au-delà du nombre de générations auquel elles mourraient précédemment. L'hybridation sur gel d'agarose fut alors réalisée afin de vérifier l'aspect des télomères des clones TLC1H b et c à différentes générations. Il est à noter que les données obtenues sont les mêmes pour les deux clones alors seuls les gels correspondant au clone c sont montrés à la figure 10. Le gel non-dénaturant (figure 10A) semble indiquer une augmentation de l'intensité du signal télomérique simple-brin humain avec le nombre de générations. De plus, la bande à 1 kb (pistes 3 et 6) semble augmenter en hétérogénéité et en longueur. Lorsque ce gel est dénaturé et hybridé avec la sonde C<sub>1.3</sub>A (sonde télomérique de levure), on constate que les contrôles TLC1WT montrent un signal caractéristique à 1,3 kb (figure 10B pistes 1-2). Toutefois, il semble y avoir une diminution de l'intensité du signal télomérique avec le nombre de génération (figure 10B pistes 3-8). Lors d'une plus faible exposition, on constate la présence des mêmes bandes caractéristiques de haut poids moléculaire dans toutes les pistes. Ce même gel fut dénaturé une seconde fois afin d'éliminer tout signal et hybridé avec la sonde télomérique humaine. On voit encore clairement une augmentation d'intensité et d'hétérogénéité du signal avec le nombre

de génération (figure 10C). Il semble donc qu'un mécanisme alternatif de réplication des télomères survienne entre les générations 150 et 1000 pour le clone TLC1Hb et entre 150 et 580 générations pour le clone TLC1Hc. Ce mécanisme pourrait être à la base de la survie à long terme des souches possédant des séquences télomériques humaines.

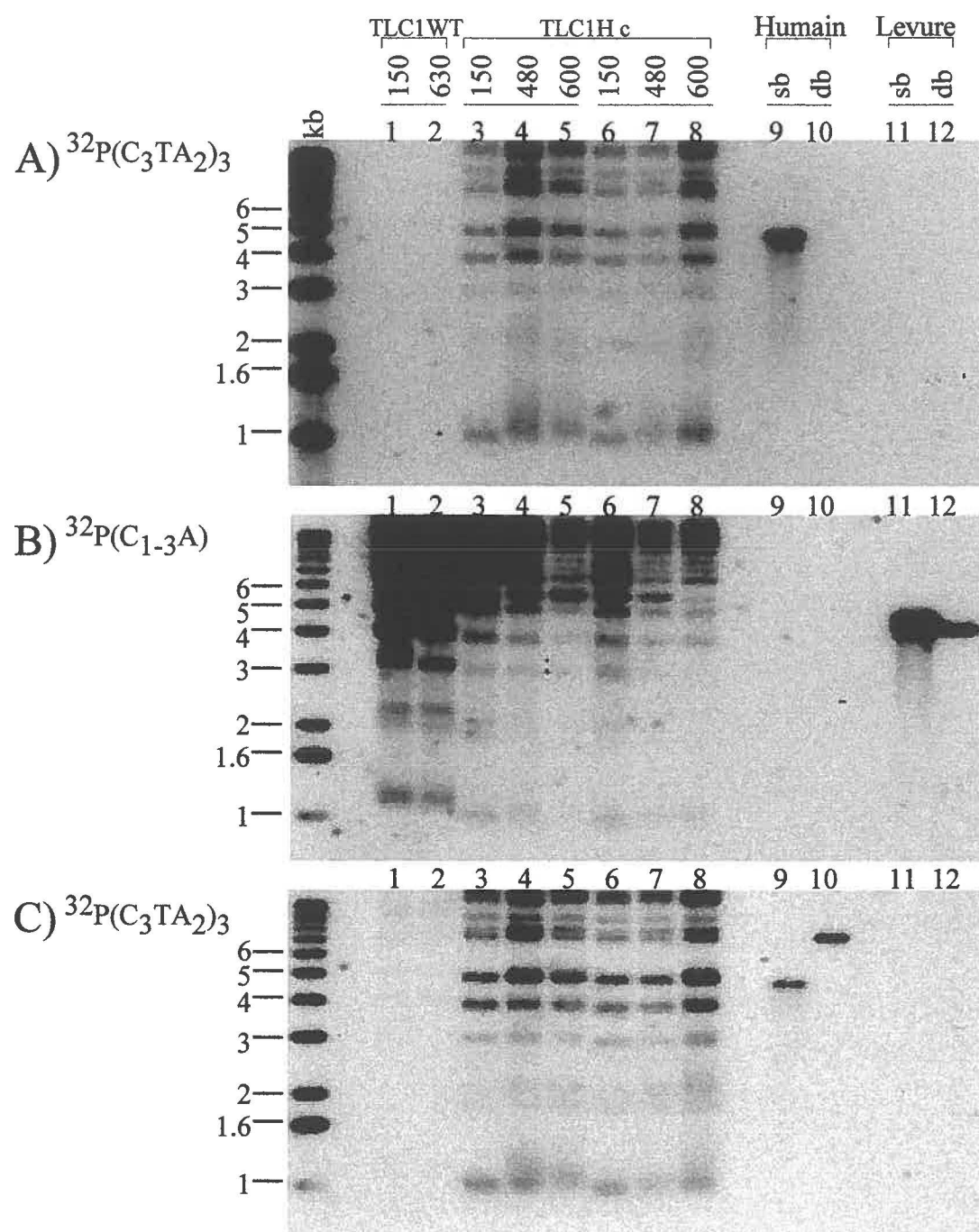


Figure 10. Analyse des télomères lors de la survie à long terme. L'ADN génomique de deux colonies de TLC1Hc (A., B. et C.) et de TLC1Hb (non montré) fut digéré et déposé sur gel d'agarose 0.75% TBE, et ce, à différentes générations. Les gels séchés non-dénaturant furent hybridés avec la sonde  $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$  ( $10^6$  CPM) (A.), puis dénaturés et réhybridés avec la sonde  $\text{C}_{1-3}\text{A}$  (22-mer) ( $10^6$  CPM) (B.) Finalement, ces mêmes gels furent redénaturés et hybridés avec la sonde  $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$  ( $10^6$  CPM) (C.). L'ADN génomique de deux colonies de TLC1Hc (A., B. et C., pistes 3-8) fut extrait à partir des cellules à 150, 480 et 600 gen. La même démarche fut réalisée pour TLC1Hb mais pour des cellules à 150, 970 et 1080 gen (non montré). L'ADN génomique des souches TLC1WTa à 150 et 630 générations (pistes 1 et 2) fut utilisé comme contrôle. Pistes 9 et 10 : 6 ng de pTLC1HTRP digéré par NsiI et dénaturé (sb) ou non-dénaturé (db). Pistes 11 et 12 : contrôles d'ADN télomérique de levure simple-brin (sb) et double-brin (db) correspondant respectivement au plasmide pMW55 digéré par BamHI (contenant 55 pb de répétitions télomérique (Sikorski et Hieter, 1989)) et à l'ADN simple-brin de phagemide dérivé de pGT55.

## **Étude des protéines hnRNPA1/UP1 dans des levures possédant des séquences télomériques terminales humaines**

Puisque nos résultats suggèrent la présence d'au moins cinq répétitions télomériques aux extrémités des chromosomes de souches de levure contenant une télomérase avec une matrice humaine, ces extensions simple-brin peuvent être considérées comme de bonnes cibles pour les protéines liant les extensions simple-brin. Comme hnRNP A1/UP1 peut lier spécifiquement les répétitions télomériques humaines simple-brin *in vitro* (Erlitzki et Fry, 1997, Ishikawa et al., 1993, McKay et Cooke, 1992) et aurait un rôle à jouer dans la biogénèse des télomères (LaBranche et al., 1998), nous avons analysé ces protéines dans les souches possédant des télomères humains en vérifiant leur niveau d'expression, leur activité ainsi que leur effet aux télomères.

### **a. Niveau d'expression d'hnRNP A1/UP1**

Les plasmides pYES2-A1, pYES2-UP1, pYES2-NLS-A1 et pYES2-NLS-UP1 ont été transformés dans la souche TLC1H (100 gen) et l'expression des protéines fut induite ou réprimée en milieu contenant du galactose ou du glucose respectivement. Le signal de localisation nucléaire (NLS) fut inséré en amont des gènes *A1/UP1* et en



aval du promoteur inductible au galactose afin d'augmenter les chances que les protéines exprimées se retrouvent au noyau. Le séquençage des différents plasmides a permis de confirmer que le cadre de lecture était conservé (données non montrées). Le niveau d'expression des différentes protéines fut ensuite analysé par immunobuvardage (« Western blot ») à l'aide de l'anticorps anti-A1/UP1 purifié (figure 11). On note l'expression d'UP1 lors de l'induction en galactose (figure 11A, piste 6) : bande correspondant au poids moléculaire d'UP1 (~ 24 kDa). Une bande supplémentaire peut être détectée dans cet extrait, possiblement causée par la forte surexpression en galactose. Ainsi, le ribosome continuerait à traduire la protéine jusqu'au prochain codon STOP, provoquant la production d'une protéine d'environ cinq kDa de plus. Un signal correspondant à NLS-UP1 est aussi détecté lors de l'induction (figure 11B pistes 7-8 et figure 11C piste 8). Cependant, malgré l'induction en galactose, aucune protéine A1 (figure 11C pistes 5-6) ou NLS-A1 (figure 11B, pistes 4-5) n'est détectée par immunobuvardage. Ceci ne semble pas être causé par une mutation car la protéine est détectée dans des extraits bactériens produits à partir du plasmide ayant servi aux différentes constructions (pGEX-A1) (données non-montrées). En présence de glucose, il y a répression de l'expression, donc aucune protéine n'est détectée (figure 11A pistes 3 et 5, figure 11B pistes 3 et 6, figure 11C pistes 1, 4 et 7). De plus, le vecteur vide (figure 11A pistes 3-4, figure 11C pistes 1-3), ainsi que les souches non-transformées (figure 11A et 11B pistes 1-2)

n'expriment pas d'A1/UP1. On retrouve A1 à sa taille correspondante, soit ~ 33 kDa dans le contrôle positif (extrait nucléaire de cellules HeLa). Ce résultat suggère que l'induction d'UP1 et de NLS-UP1 est possible dans la souche contenant des séquences télomériques humaines et que la protéine A1 n'est pas détectable par immunobuvardage lors de l'induction de son expression.

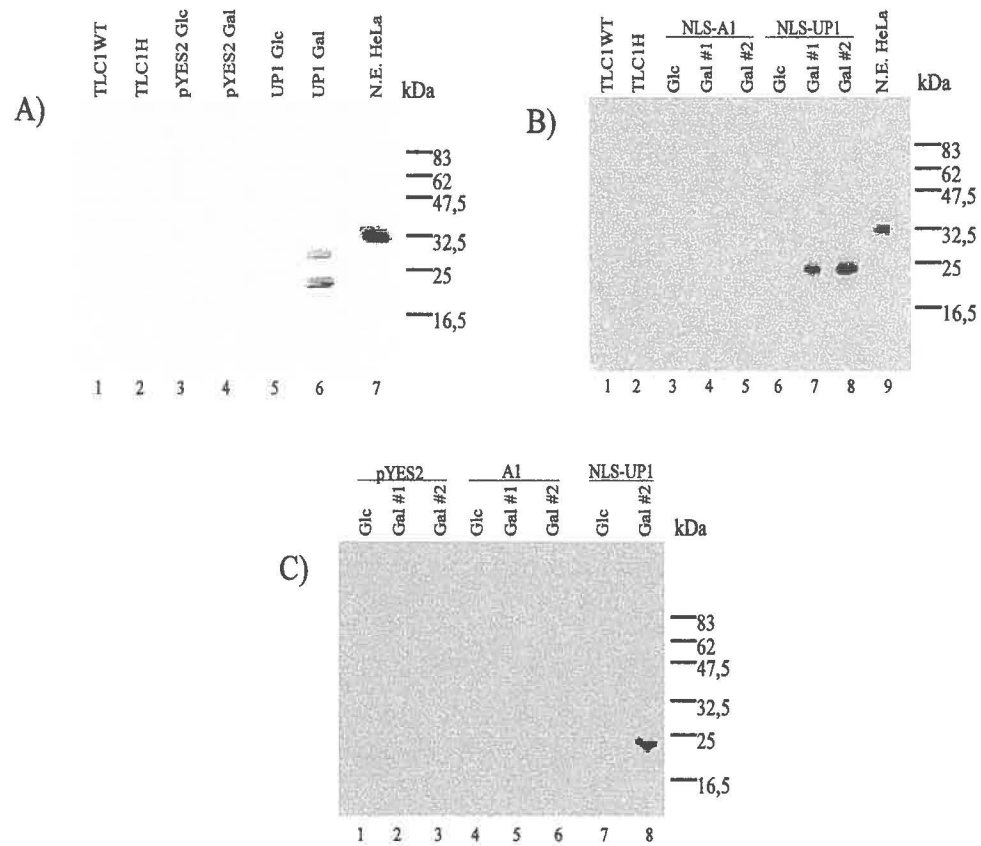


Figure 11. Niveau d'expression de hnRNP A1/UP1. Après induction ou répression de l'expression des différentes protéines en milieu liquide contenant du galactose ou du glucose, les extraits totaux furent dosés par Bradford et  $\sim 8 \mu\text{g}$  d'extraits totaux furent analysés par immunobuvardage avec l'anticorps anti-A1/UP1 purifié. **A.** et **B.** Pistes 1-2 : souches TLC1WT et TLC1H non transformées. **A., B.** et **C.** : souches transformées avec les plasmides pYES2, pYES2-NLS-A1, pYES2-NLS-UP1, pYES2-A1 ou pYES2-UP1. Glc : culture en milieu glucose  $\sim 16$  heures. Gal : culture en milieu galactose  $\sim 16$  heures (#2 : induction prolongée d'environ 1 jour). N.E. HeLa :  $1 \mu\text{l}$  d'extrait nucléaire de cellule HeLa, fourni par le laboratoire du Dr. Benoît Chabot.

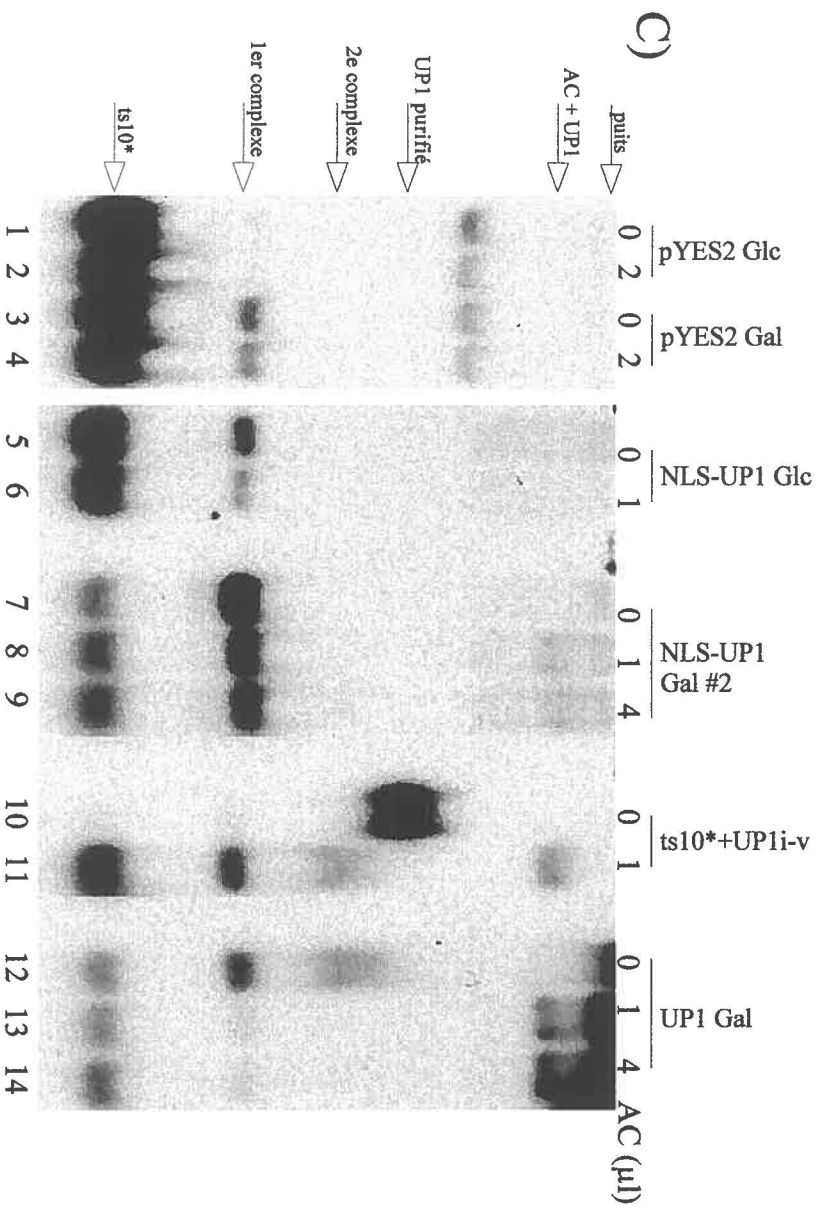
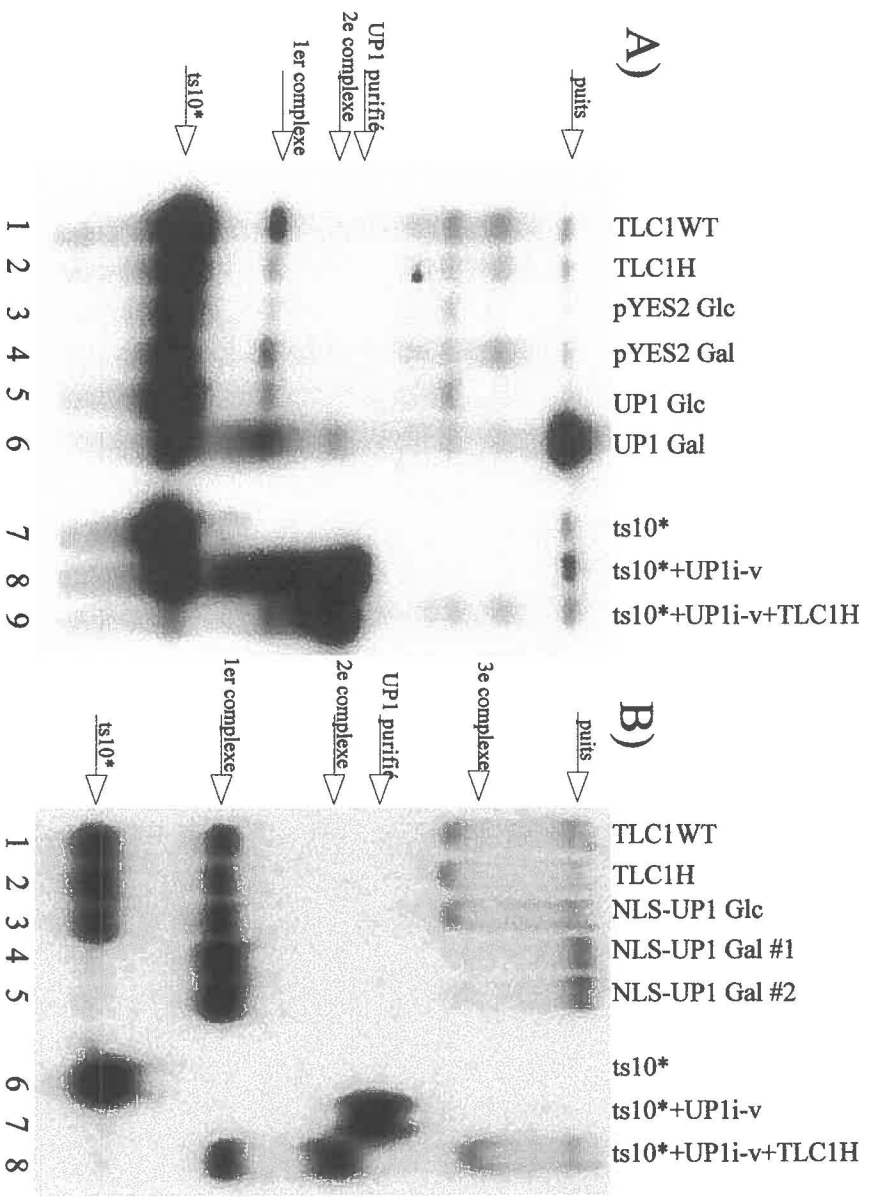
## **b. Vérification de l'activité de UP1 et NLS-UP1 par gel de retardement**

Étant donné les données précédentes, nous avons concentré nos efforts sur les protéines UP1 et NLS-UP1. Nous avons donc vérifié l'activité des protéines UP1 et NLS-UP1 afin de voir si elles étaient en mesure de lier des séquences télomériques humaines par gel de retardement. Pour ce faire, un oligo composé de 10 séquences télomériques humaines (ts10 radiomarké) fut utilisé (figure 12). Comme contrôle, nous avons utilisé la protéine UP1 purifiée *in vitro*. Lorsqu'un oligo ts10 est saturé de cette protéine, un ou deux complexes sont formés selon la quantité d'oligo ajouté (figure 12A piste 8, 12B piste 7 et 12C piste 10). En quantité non-saturante d'UP1, on retrouve plusieurs complexes de mobilité intermédiaire (Dallaire et al., 2000). Lorsqu'UP1 purifié est en présence d'extrait protéique de levure, certaines protéines compétitionnant avec UP1 pour la liaison à ts10 entraînent la formation de différents complexes mimant les complexes de mobilité intermédiaire ci-haut mentionnés (figure 12A piste 9 et 12B piste 8, 1er, 2e et 3e complexe). L'induction d'UP1 dans la souche TLC1H génère un retard de migration dans le gel, reflétant la liaison de la protéine à ts10 (figure 12A piste 6). Ce retard de migration corrèle avec celui observé lorsque UP1 recombinant est mélangé avec un extrait total de levure (figure 12A, piste 9, 2e complexe). On remarque aussi une augmentation du signal correspondant au premier complexe (figure 12A piste 6). Lors de l'expression de NLS-UP1 (figure

12B, pistes 4-5), on observe une augmentation de l'intensité du signal du premier complexe et une disparition presque complète du signal correspondant à l'oligo seul. Donc, la similarité des complexes observés en présence d'UP1 purifié et d'UP1 induit *in vivo* dans la levure semble indiquer que ce dernier est en mesure de lier les séquences télomériques humaines.

Afin de vérifier si cette liaison est spécifique à la protéine NLS-UP1, l'anticorps anti-A1/UP1 fut ajouté lors de la réaction. On constate qu'un complexe migrant beaucoup moins vite est formé dans la réaction avec l'anticorps et ce, pour les protéines NLS-UP1 (AC + UP1, figure 12C pistes 8-9), UP1 (figure 12C pistes 13-14) et UP1 purifié (figure 12C piste 11). Ce complexe n'est pas détecté en absence d'anticorps (figure 12C pistes 7,10 et 12) et 1 µl de cet anticorps semble suffisant pour créer ce complexe (pistes 8, 11 et 13 de la figure 12C). On note aussi une diminution du signal correspondant au premier complexe avec une quantité d'anticorps croissante (figure 12C pistes 7-9). Lors de l'ajout d'anticorps à la protéine UP1 purifiée, plusieurs complexes intermédiaires sont formés (figure 12C piste 11). Le gros complexe formé par l'ajout d'anticorps (toujours présent à la figure 12C piste 11, AC + UP1) pourrait être plus ou moins stable, entraînant le décrochement de certaines protéines, ce qui créerait l'apparition des différents complexes intermédiaires. Cette stabilité plus ou moins forte recréerait les différents complexes

observés lors de l'ajout d'extrait de TLC1H (figure 12A, piste 9). Lors de l'ajout d'anticorps, il est possible que les protéines présentes dans l'extrait de levure soient en mesure de stabiliser le complexe migrant très lentement (AC + UP1), étant donné l'absence des complexes de mobilité intermédiaire (figure 12C, pistes 7-9 et 12-14). Aucun retard de migration spécifique n'est observé avec le vecteur vide en présence ou en absence d'anticorps (figure 12A pistes 3-4 et figure 12C pistes 1-4), avec les souches non-transformées (figure 12A et 12B pistes 1-2) ou les souches transformées en milieu glucose (figure 12A piste 5, 12B piste 3 et 12C piste 5-6). Les retards non-spécifiques observés peuvent être causés par des protéines de levure liant le simple-brin télomérique humain. Par exemple, CDC13 a une certaine affinité pour les séquences télomériques humaines, bien que dix fois moins grande que pour les séquences télomériques de levure (Lin et Zakian, 1996). Ainsi, les résultats suggèrent que UP1 et NLS-UP1 produits dans la souche de levure contenant des séquences télomériques humaines sont actives *in vivo* chez la levure puisqu'elles semblent être en mesure de lier des séquences télomériques humaines *in vitro*.



**Figure 12. Analyse du niveau d'activité de UP1 et NLS-UP1 par gel de retardement.**

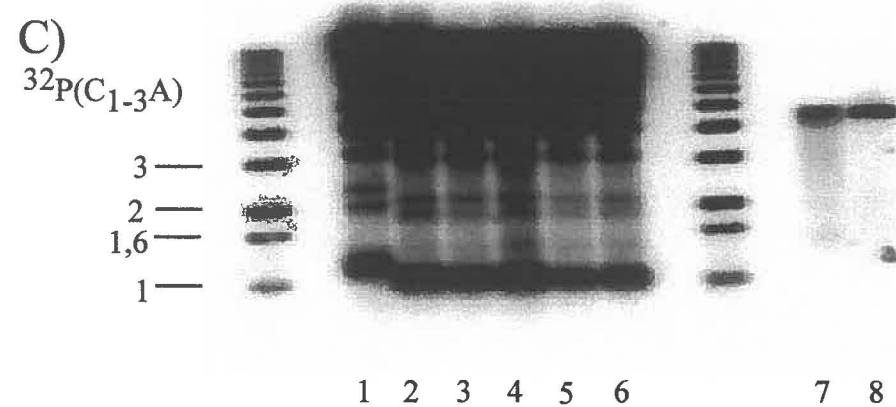
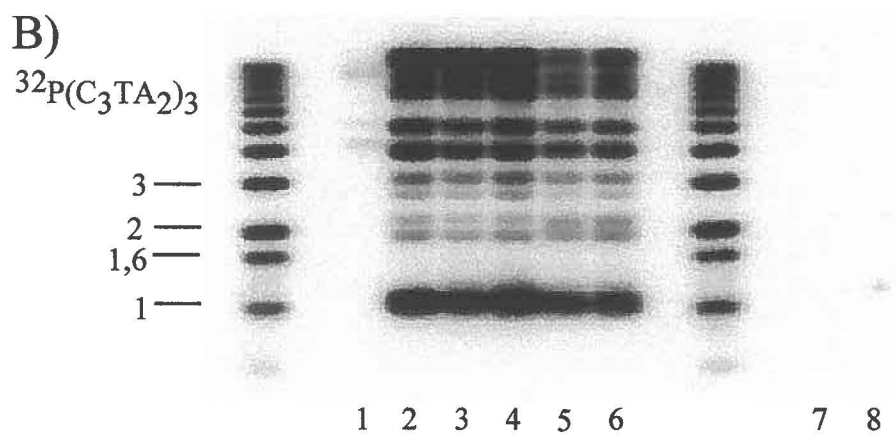
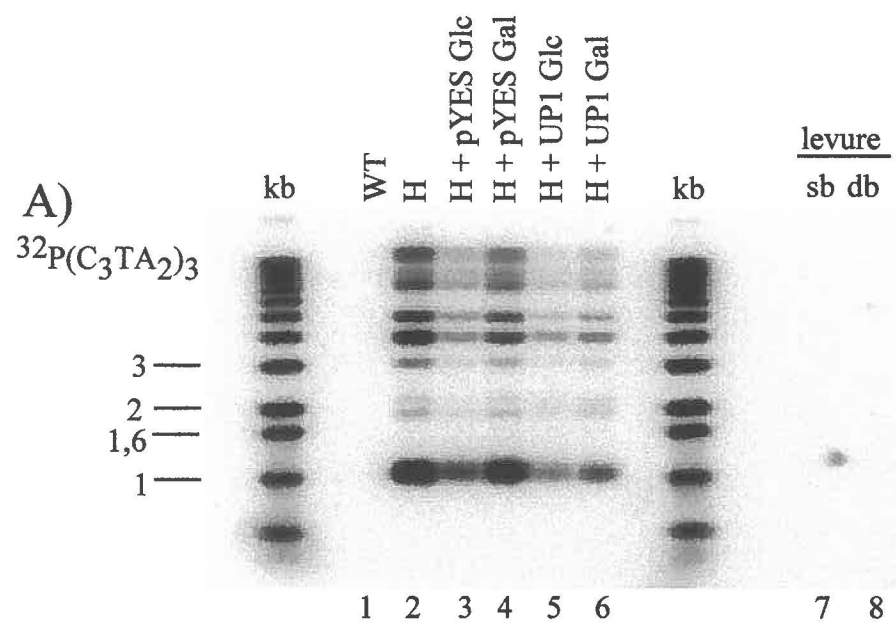
Quatre µg d'extrait total de levure furent incubés avec l'oligo ts10 radiomarqué. La réaction est migrée sur gel non-dénaturant. **A.** Pistes 1-2 : souches TLC1WT et TLC1H non transformées. Pistes 3-6 : TLC1H transformée avec les plasmides pYES2 ou pYES2-UP1, poussées en milieu glucose (Glc) ou galactose (Gal). Piste 7 : oligo ts10 marqué. Piste 8 : oligo ts10 marqué en présence de UP1 purifiée *in vitro*. Piste 9 : oligo ts10 marqué en présence de UP1 purifiée *in vitro* et d'extrait total de la souche TLC1H non transformée. **B.** Pistes 1-2 : souches TLC1WT et TLC1H non transformées. Pistes 3-5 : TLC1H transformée avec le plasmide pYES2-NLS-UP1, poussée en milieu glucose (Glc) ou galactose (Gal) ~16 heures (#2 : induction prolongée d'environ 1 jour en milieu galactose). Pistes 6-8 : voir pistes 7-9 de A. **C.** TLC1H transformée avec les plasmides pYES2 (pistes 1-4), pYES2-NLS-UP1 (pistes 5-9) ou pYES2-UP1 (pistes 12-14), poussée en milieu glucose (Glc) ou galactose (Gal) ~16 heures (#2 : induction prolongée d'environ 1 jour en milieu galactose). Pistes 10 et 11 : oligo ts10 marqué en présence de UP1 purifiée *in vitro*. Lors de l'incubation, la réaction se fait en présence ou en absence d'anticorps (AC : µl d'anticorps anti-A1/UP1 purifié). ts10\* : oligo marqué correspondant à dix répétitions télomériques humaines. Quantité d'oligo : 0,013 pmole en A, 0,026 pmole en B et 0,04 pmole en C (0,012 pmole pour pYES2). UP1i-v : protéine UP1 (0,08 µg) purifiée *in vitro*, fournie par le laboratoire du Dr. Benoît Chabot. 1er, 2e et 3e complexe :

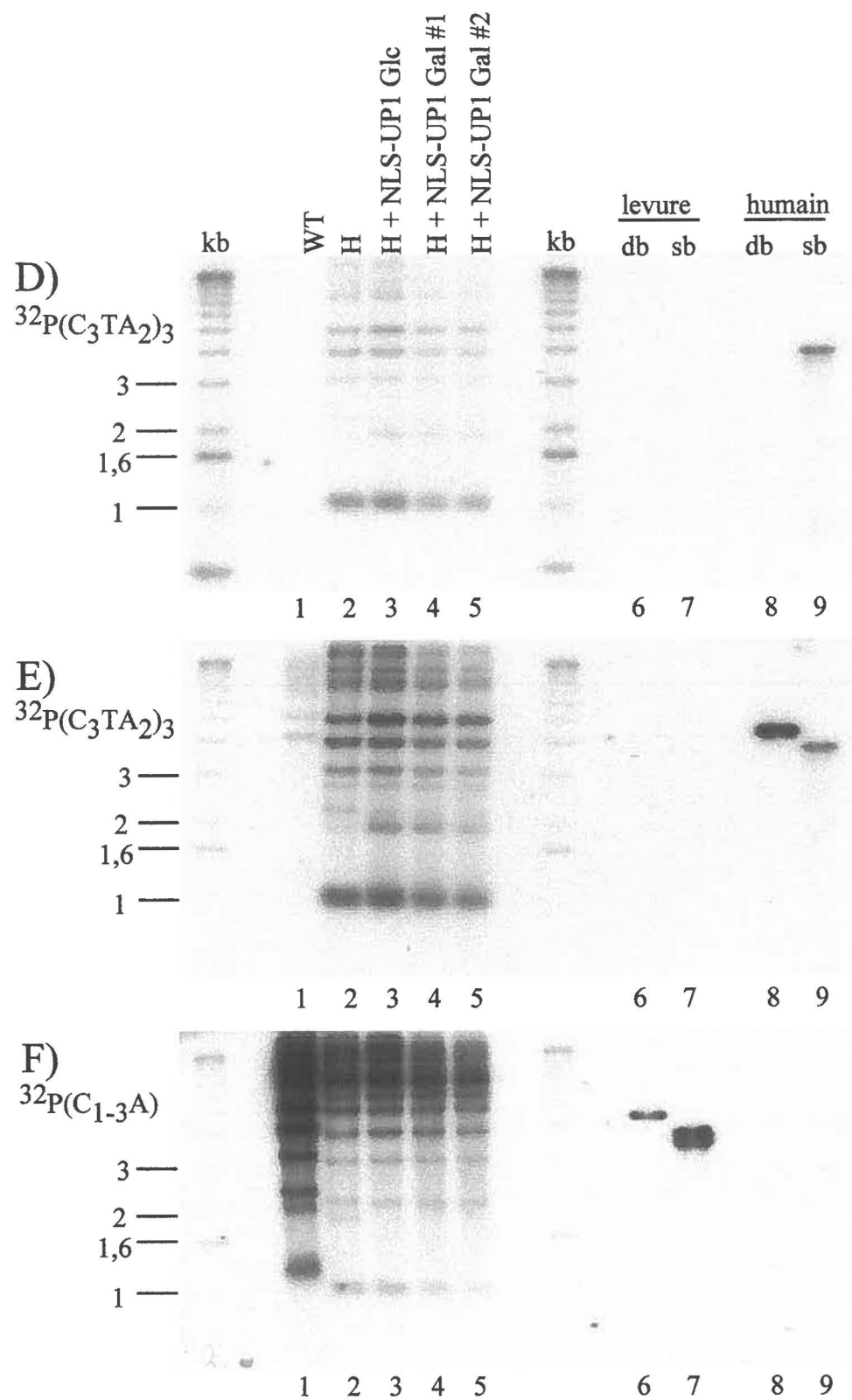


différents complexes de mobilité intermédiaire formés en quantité non saturantes de UP1. UP1 purifié : complexe formé en quantité saturante d'UP1. AC + UP1 : complexe formé lors de l'ajout d'anticorps anti-A1/UP1 à la réaction.

### **c. Effet des protéines UP1 et NLS-UP1 aux télomères**

Comme UP1 produit semble être capable de lier les séquences télomériques humaines, on a voulu savoir si cette protéine avait un effet sur les télomères des souches de levure avec des séquences télomériques terminales humaines. Pour analyser cet aspect, des gels de télomères furent réalisés (figure 13). On ne note aucune différence de longueur des télomères dans les souches où l'expression de UP1 (figure 13A-C, piste 6) ou NLS-UP1 (figure 13D-F, pistes 4-5) est induite. En effet, les gels non-dénaturants hybridés avec une sonde télomérique humaine (figure 13A et 13D) ne montre aucune différence de longueur des TRFs (toujours à ~1 kb). Les mêmes résultats sont observés pour les souches en milieu glucose, non-transformées ou transformées avec le plasmide vide. De plus, on ne peut conclure à une variabilité de la quantité d'ADN simple-brin lors de l'expression d'UP1 puisque les quantités d'ADN varient sensiblement de la même façon dans les gels dénaturants (figure 13B, 13C, 13E et 13F). Ces résultats suggèrent que la surexpression de UP1 et NLS-UP1 n'ont aucun effet marqué sur les télomères des souches TLC1H.





**Figure 13 : Effet des protéines UP1 et NLS-UP1 aux télomères.** L'ADN génomique des cultures en glucose (Glc) ou galactose (Gal) fut extrait et digéré par XhoI. Les cellules sont poussées en milieu glucose ou galactose ~16 heures (#2 : induction prolongée d'environ 1 jour en milieu galactose). **A.** et **D.** La technique d'hybridation de gel d'agarose (0,75% TBE) séché non-dénaturant fut utilisée en employant une sonde  $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$  ( $10^6$  CPM). **B.** et **E.** Ce même gel fut dénaturé puis réhybridé avec la même sonde. **C.** et **F.** Le gel fut redénaturé puis hybridé avec une sonde  $\text{C}_{1,3}\text{A}$  (22-mer) ( $10^6$  CPM). **A.**, **B.** et **C.** Pistes 1-2 : souches TLC1WT et TLC1H non-transformées. Pistes 3-6 : TLC1H transformée avec les plasmides pYES2 ou pYES2-UP1. **D.**, **E.** et **F.** Pistes 1-2 : souches TLC1WT et TLC1H non-transformées. Pistes 3-5 : TLC1H transformée avec pYES2-NLS-UP1. Levure : contrôles d'ADN télomérique de levure simple-brin (sb) et double-brin (db) correspondant respectivement au plasmide pMW55 digéré par BamHI (contenant 55 pb de répétitions télomérique (Sikorski et Hieter, 1989)) et à l'ADN simple-brin de phagemide dérivé de pGT55. Humain : 6 ng de pTLC1HTRP digéré NsiI dénaturé (sb) ou non-dénaturé (db). kb : échelle de poids moléculaire de 1 kb.

## **Analyse de complémentation des sous-unités de la télomérase humaine et de levure**

Comme une souche de levure avec des séquences télomériques humaines aux extrémités de ses chromosomes semble viable, nous avons testé si les sous-unités complètes de la télomérase humaine (hTR et hTERT) pouvaient compléter l'absence des sous-unités de la télomérase de levure (TLC1 et EST2).

Pour ce faire, nous avons utilisé la souche de départ BY4705 [*Mata/Mata* $\alpha$ , *ade2* $\Delta$ ::*hisG/ade2* $\Delta$ ::*hisG*, *his3* $\Delta$ 200/*his3* $\Delta$ 200, *leu2* $\Delta$ 0/*leu2* $\Delta$ 0, *met15* $\Delta$ 0/*met15* $\Delta$ 0, *trp1* $\Delta$ 63/*trp1* $\Delta$ 63, *ura3* $\Delta$ 0/*ura3* $\Delta$ 0] (Brachmann et al., 1998) étant donné la disponibilité des différents marqueurs de sélection. La stratégie élaborée est illustrée à la figure 14. Tout d'abord, les gènes *TLC1* et *EST2* furent délétés (délétions récessives) et remplacés par *KanMx4* et *HIS3* respectivement (voir Matériel et méthodes). La délétion du gène *TLC1* a pour effet de conserver les 20 premières et dernières pb du gène (Singer et Gottschling, 1994). Pour sa part, la délétion du gène *EST2* a pour conséquence d'enlever les domaines essentiels pour son activité (RT). Les délétions furent confirmées par Southern blot et par une mort cellulaire après 80 et 100 générations. 1  $\mu$ g des plasmides pEST2-LYS2 et pTLC1TRP (ou pTLC1HTRP) furent ensuite transformés séquentiellement dans ces cellules avant de

procéder à la sporulation. Des conditions trophiques défavorables permettent aux cellules diploïdes d'entrer en méiose et de produire quatre spores. La sporulation a donc permis d'obtenir des souches haploïdes où les deux gènes ne sont plus fonctionnels dans le génome, mais dont la survie est assurée par les plasmides transformés (la délétion de *EST2* et/ou *TLC1* mène à la sénescence (Cohn et Blackburn, 1995, Lingner et al., 1997a, Lundblad et Szostak, 1989, Singer et Gottschling, 1994)). Les télomères de ces spores furent analysés par hybridation dans le gel (figure 15).

Comme pour les souches TLC1H (figure 6), on remarque la présence de simple-brin télomérique humain dans les spores contenant le gène *TLC1* avec la matrice humaine (figure 15A, pistes 4-6), que le signal est absent dans les spores contenant le plasmide avec la matrice de levure (pistes 2-3) et que les télomères avec des séquences humaines sont plus courts (TRFs d'environ 1 kb) (figure 15C, pistes 4-6) que les télomères de levure (TRFs d'environ 1,3 kb) (pistes 2-3). Cela suggère que les souches haploïdes sont en mesure d'utiliser la matrice disponible pour leur survie, tout comme les souches TLC1H (figure 6).

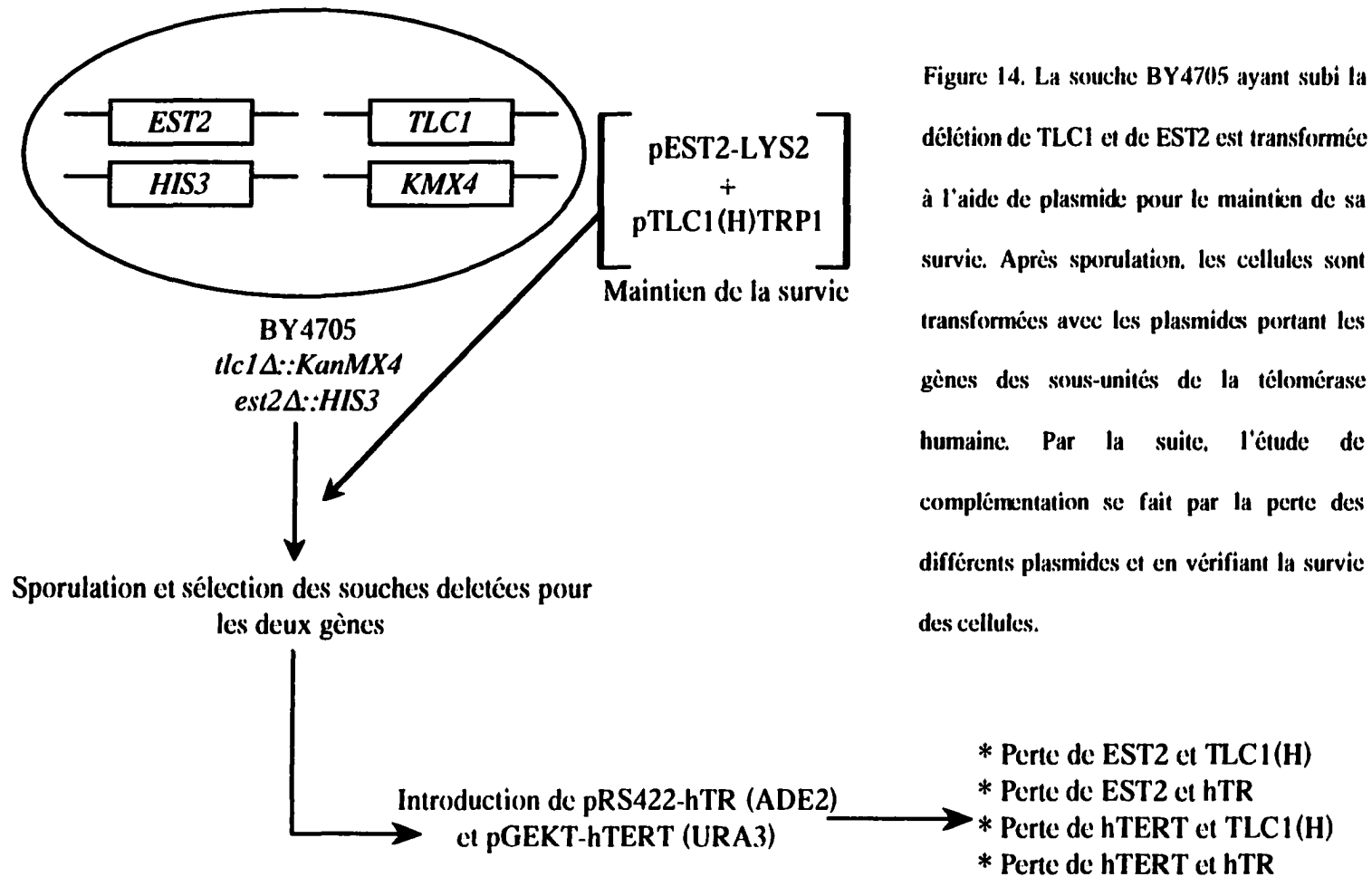
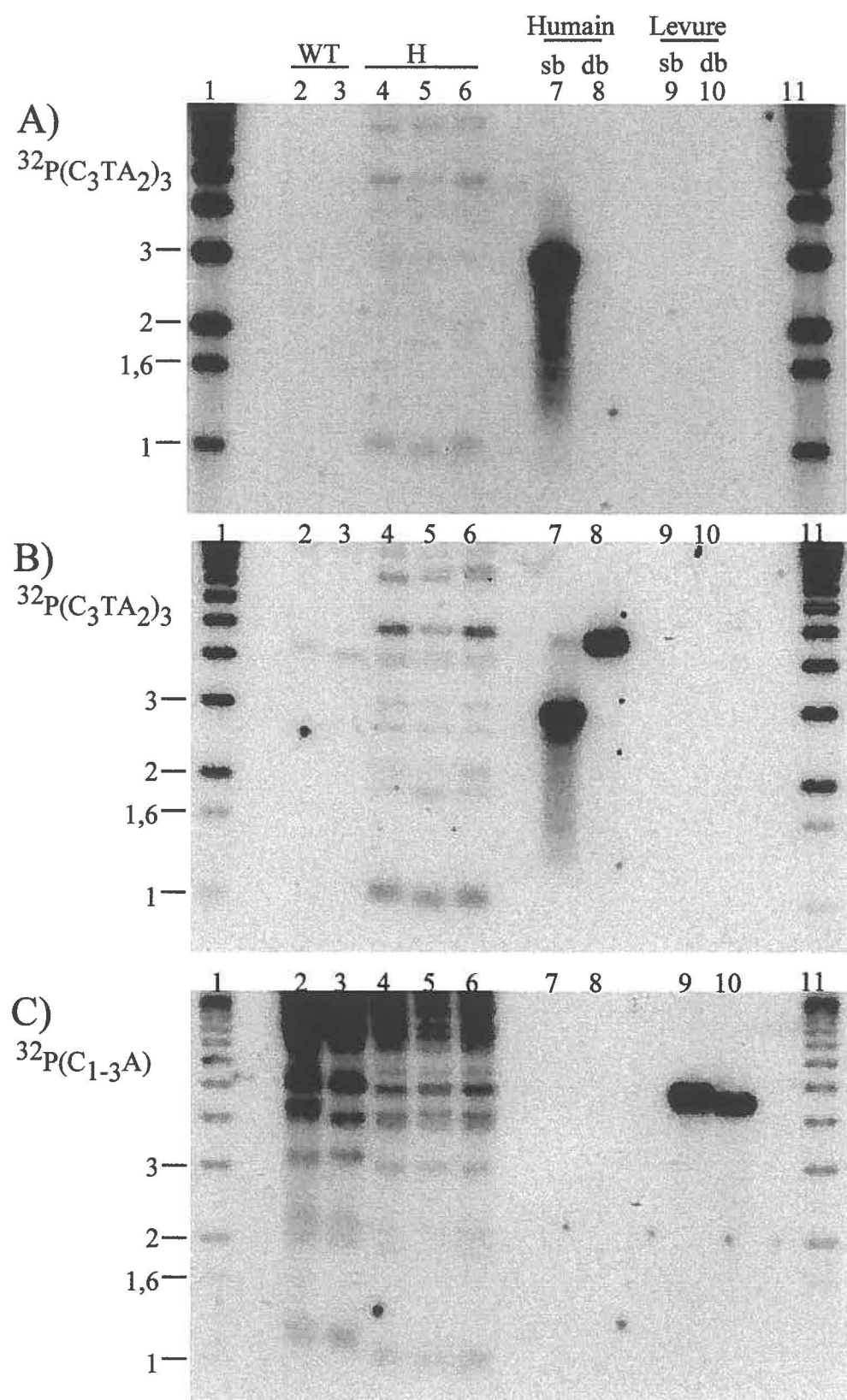


Figure 14. La souche BY4705 ayant subi la délétion de *TLC1* et de *EST2* est transformée à l'aide de plasmide pour le maintien de sa survie. Après sporulation, les cellules sont transformées avec les plasmides portant les gènes des sous-unités de la télomérase humaine. Par la suite, l'étude de complémentation se fait par la perte des différents plasmides et en vérifiant la survie des cellules.





**Figure 15. Vérification des télomères des souches haploïdes *tlc1Δ* et *est2Δ* contenant les gènes *TLC1* (avec la matrice humaine ou de levure) et *EST2* sur plasmides.**

L'extraction de l'ADN génomique de deux clones WT (matrice de levure) et trois clones H (matrice humaine) fut suivie d'une digestion par *XhoI*. **A.** La technique d'hybridation de gel d'agarose (0,75% TBE) séché non-dénaturant fut utilisée en employant une sonde  $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$  ( $10^6$  CPM). **B.** Ce même gel fut dénaturé puis hybridé avec la même sonde qu'en A. **C.** Le gel fut redénaturé puis hybridé avec une sonde  $\text{C}_{1,3}\text{A}$  (22-mer) ( $10^6$  CPM). Pistes 1 et 11 : échelle de poids moléculaire de 1 kb.

Pistes 2-3 : 2 spores *tlc1Δ* et *est2Δ* contenant les plasmides pEST2-LYS2 et pTLC1TRP. Pistes 4-6 : 3 spores *tlc1Δ* et *est2Δ* contenant les plasmides pEST2-LYS2 et pTLC1HTRP. Pistes 7 et 8 : contrôles d'ADN télomérique humain : 6 ng de pTLC1HTRP linéarisé avec *NsiI* et dénaturé (8) ou non-dénaturé (9). Pistes 9 et 10 : contrôles d'ADN télomérique de levure simple-brin (sb) et double-brin (db) correspondant respectivement au plasmide pMW55 digéré par *BamHI* (contenant 55 pb de répétitions télomérique (Sikorski et Hieter, 1989)) et à l'ADN simple-brin de phagemide dérivé de pGT55.

Étant assuré de la présence de séquences télomériques humaines terminales, nous avons transformés séquentiellement les plasmides pRS422-hTR (*ADE2*) et pEGKT-hTERT (*URA3*) (inductibles au galactose) dans ces spores en sélectionnant sur un milieu sélectif YC-TRP-LYS-HIS-ADE-URA + 2% glucose. Il est à noter que l'expression de GST-hTERT ainsi que l'activité télomérasique furent confirmées par le laboratoire de Chantal Autexier. En effet, la protéine GST-hTERT (~150 kDa) est bel et bien exprimée dans les souches TLC1H (figure 16A, pistes 2-3) et TLC1WT (figure 16A, piste 1), comme pour le contrôle positif (figure 16A, piste 5). De plus, l'activité télomérasique s'est avérée positive lors de l'expression de GST-hTERT et hTR dans les souches TLC1WT (figure 16B, piste1) et TLC1H (figure 16B, pistes 2-3). Malgré son intensité plus faible, le patron de bande obtenu est caractéristique du patron obtenu dans les contrôles positifs (figure 16B, pistes 4-5). Par la suite, afin de conditionner les cellules pour la perte de plasmide, nous avons fait croître celles-ci sur des milieux non-sélectifs. Voici un exemple : afin de sélectionner des cellules ne conservant que les plasmides pRS422-hTR (*ADE2*) et pEGKT-hTERT (*URA3*), les cellules furent poussées dans un milieu liquide YC-ADE-URA et ensuite étalées sur milieu solide (même sélection). Pour identifier les colonies ayant perdu les deux autres plasmides (pEST2-LYS2 et pTLC1TRP ou pTLC1HTRP), celles-ci furent striées en parallèle sur des milieux YC-ADE-URA-TRP, YC-ADE-URA-LYS et YC-ADE-URA. Ainsi, les colonies ne conservant que les plasmides avec les gènes voulus

(*hTR* et *hTERT*) ne poussaient que sur milieu YC-ADE-URA. Puisque les sous-unités humaines ne sont exprimées qu'en milieu contenant du galactose (promoteur  $P_{GAL}$ ), il était important de remplacer le glucose (normalement utilisé) par du galactose afin d'assurer l'expression de ces sous-unités et leur activité et ce, dès la perte des autres plasmides. Lorsque les plasmides désirés sont conservés dans les cellules, celles-ci sont restreintes pour vérifier leur survie. Le tableau 4 résume la survie des souches contenant les différents plasmides.

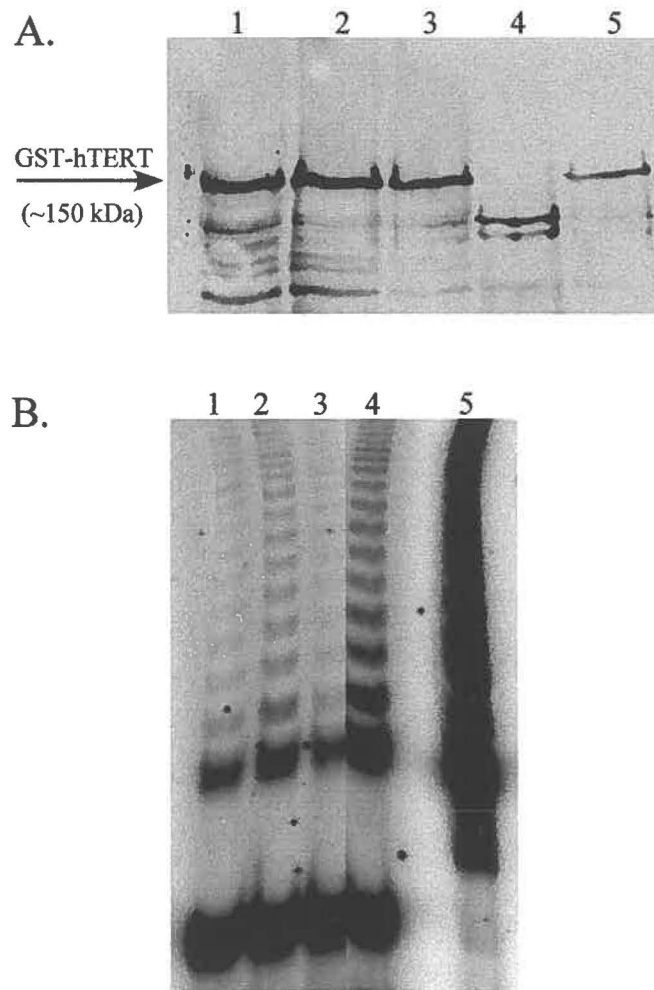


Figure 16. Contrôles d'expression de GST-hTERT et d'activité télomérasique. Les résultats de cette figure sont fournis par François Bachand et Chantal Autexier. **A.** L'expression de la protéine GST-hTERT (~150 kDa) fut vérifiée par immunobuvardage avec l'anticorps anti-hTERT (Bachand, 1999). Piste 1: GST-hTERT/hTR dans TLC1WT. Pistes 2-3: 2 clones de GST-hTERT/hTR dans TLC1H. Piste 4: contrôle négatif: GST/hTR dans YPH499. Piste 5: contrôle positif: GST-hTERT/hTR dans YPH499. **B.** L'activité télomérasique fut analysée par "Trap assay" ou "Telomerase Activity Assay" modifié (Bachand, 1999). Piste 1: GST-hTERT/hTR dans TLC1WT. Pistes 2-3: 2 clones de GST-hTERT/hTR dans TLC1H. Piste 4: contrôle positif: GST-hTERT/hTR dans YPH499. Piste 5: contrôle positif: lysat de cellules 293.

Souche	Survie	Souche	Survie
<b>TLC1WT, EST2</b>	> 150 gen	<b>TLC1H, EST2</b>	> 150 gen
TLC1WT	Mort à ~ 90 gen	TLC1H	Mort à < 50 gen
EST2	Mort à ~ 90 gen	EST2	Mort à < 50 gen
Aucun plasmide	Mort à ~ 90 gen	Aucun plasmide	Mort à < 50 gen
<b>TLC1WT, EST2, hTR, hTERT</b>	> 150 gen	<b>TLC1H, EST2, hTR, hTERT</b>	> 150 gen
TLC1WT, EST2	> 150 gen	TLC1H, EST2	> 150 gen
TLC1WT, hTERT	Mort à ~ 70 gen	TLC1H, hTERT	Mort à < 50 gen
EST2, hTR	Mort à ~ 70 gen	EST2, hTR	Mort à < 50 gen
hTR, hTERT	Mort à ~ 70 gen	hTR, hTERT	Mort à < 50 gen

Tableau 4. Vérification de la complémentation entre les sous-unités des télomérases humaines et de levure. La survie des différentes souches fut mesurée par strie sur milieu sélectif (~20 gen/strie). La souche BY47705 *tlc1Δ::KanMx4 est2Δ::HIS3* haploïde contient différents plasmides correspondant aux sous-unités des télomérases humaine et de levure. TLC1WT: pTLC1TRP. EST2: pEST2-LYS2. hTR: pRS422-hTR. hTERT: pEGKT-hTERT.

Ainsi, les souches haploïdes exprimant les gènes *EST2* et *TLC1* avec la matrice humaine ou de levure survivent pour au moins 150 générations. Cependant, les souches avec des télomères de levure ou d'humain meurent à ~90 gen ou 30-50 gen respectivement lorsqu'une des sous-unités est absente. Les souches contenant les quatre sous-unités (avec la matrice humaine ou de levure) sont aussi en mesure de maintenir leur survie pour au moins 150 gen. Cependant, dès qu'une des sous-unités de la télomérase de levure est absente, les cellules montrent le phénotype classique de sénescence (~70 gen pour les cellules possédant des télomères de levure et 30-50 gen pour les cellules avec des séquences télomériques terminales humaines). Puisque les souches sont incapables de maintenir la survie avec les différentes combinaisons de plasmides, cela suggère qu'il n'y a pas de complémentation entre les différentes sous-unités. Le fait que les télomères des levures contenant la matrice humaine soient déjà courts (TRFs d'environ 1 kb) lors de l'induction des sous-unités de la télomérase humaine (figure 15) pourrait expliquer leur mort précoce par rapport aux souches contenant la matrice de levure (TRFs d'environ 1,3 kb). En effet, si la télomérase humaine est incapable d'agir aux extrémités télomériques humaines des souches de levure, la longueur critique des télomères menant à la sénescence est atteinte plus rapidement lors de la dégradation de ces extrémités.

#### **4. DISCUSSION ET CONCLUSION**

##### **Construction d'une souche de levure avec des séquences télomériques humaines**

Des études réalisées par Henning et al. ont montré que le remplacement de la matrice de 16 pb de TLC1 par la séquence matrice humaine avait pour conséquence d'ajouter des séquences télomériques humaines à l'extrémité des chromosomes de levure et que ces cellules étaient viables pour au moins 150 générations (Henning et al., 1998). Ceci semblait surprenant puisque la plupart des mutations créées dans la matrice de TLC1 entraîne un phénotype *Est* (raccourcissement progressif des télomères et diminution graduelle dans la viabilité cellulaire) (Prescott et Blackburn, 1997a, Prescott et Blackburn, 1997b, Singer et Gottschling, 1994).

Au cours de mes travaux, nous avons vérifié si ces résultats étaient reproductibles dans les souches utilisées au laboratoire. Les résultats obtenus démontrent qu'il y a bel et bien ajout de séquences télomériques humaines aux extrémités des chromosomes de levure contenant une matrice humaine dans le gène *TLC1* et que les TRFs sont plus courts (~ 1 kb) que ceux d'une souche de type sauvage (~ 1,3 kb). Par hybridation de gel d'agarose non-dénaturant et des lavages à température croissante, nous avons conclu que l'extension télomérique simple-brin



humaine était d'au moins 30 bases. La structure des extrémités des chromosomes de ces souches semble légèrement affectée puisqu'une petite diminution du TPE est observée.

L'étude de la viabilité à long terme a montré que la mort cellulaire survenait de façon aléatoire dans les souches contenant des séquences télomériques terminales humaines et que les souches striées à partir des cellules congelées avant leur mort ne montrent plus de sénescence. Après séquençage, Henning et al ont montré qu'une portion significative de l'ADN télomérique était remplacé par des séquences humaines mais qu'il y avait conservation de quantités substantielles de séquences télomériques de levure (parfois plus de 100 pb), sans égard à la quantité d'ADN télomérique humain et que ces séquences semblaient requises pour la stabilité des télomères (Henning et al., 1998). Nos résultats indiquent qu'à long terme, une augmentation de la longueur, de l'hétérogénéité et de la quantité d'ADN télomérique simple-brin humain dans ces cellules accompagne une diminution (pratiquement totale) de la quantité d'ADN télomérique de levure avec le nombre de générations. Les phénotypes télomériques de ces clones pourraient ressembler à ceux observés lors d'arrivée de survivants (Lundblad et Blackburn, 1993, Teng et Zakian, 1999). Les survivants de type I sont caractérisés par de très courtes répétitions télomériques terminales (TRFs d'environ 1 kb), une absence des bandes télomériques entre 1 et 6

kb et une forte amplification des éléments Y' (5,2 et 6,7 kb) (Chen et al., 2001). Les survivants de type II possèdent plusieurs bandes télomériques distinctes entre 1 et 6 kb représentant les chromosomes avec différentes longueurs de répétitions télomériques, des séquences télomériques terminales rallongées et hétérogènes et parfois une amplification modeste des éléments Y' (Teng et Zakian, 1999).

Les survivants décrits dans cette étude pourrait correspondre à des survivants de type I, étant donné l'absence de bandes télomériques entre 1 et 6 kb. Cependant, contrairement aux survivants de type I, aucune amplification caractéristique des éléments Y' ne semble présente (5,2 et 6,7 kb) et les télomères sont légèrement allongés et plus hétérogènes. Le modèle proposé est illustré à la figure 17. La matrice humaine de la télomérase irait tout d'abord appairer ses deux derniers C aux deux derniers G d'un télomère. Par la suite, il y aurait élongation et ajout de séquences télomériques humaines. Cdc13 médierait le recrutement de la télomérase. Cependant, puisque Cdc13 est fixé majoritairement aux répétitions télomériques TG<sub>1-3</sub>, ce recrutement deviendrait difficile dû à l'éloignement entre l'extrémité et la jonction entre les séquences de levure et humaines. À ce moment, il y aurait synthèse du brin C-riche (même si nous n'avons aucune évidence que les séquences télomériques humaines sont maintenant incluses dans le double-brin des chromosomes de levure) et parallèlement, dégradation des brins G- et C-riches par des nucléases étant donné le

manque de protection aux nouvelles extrémités. Un équilibre pourrait se former pendant un certain temps entre la dégradation et l'élongation afin de maintenir une longueur des TRFs d'environ 1 kb. Cependant, la dégradation pourrait parfois se produire jusqu'à l'intérieur des séquences télomériques de levures, ne laissant que très peu ou pas de séquences télomériques de levure. Cette dégradation accrue pourrait aussi affecter certains gènes importants, amenant la majorité des cellules à entrer en sénescence. On pourrait donc croire qu'une certaine quantité de répétitions télomériques de levure est nécessaire pour la stabilité des chromosomes. Il est aussi possible que lors des striages, j'ai pu piqué une colonie étant, pour une raison ou une autre, en sénescence, expliquant la mort des souches de façon stochastique. En effet, cette colonie a pu subir une mutation quelconque affectant une voie métabolique essentielle pour sa survie.

Le manque de protection aux nouvelles extrémités n'est probablement pas absolu étant donné la survie des cellules. Comme Cdc13 possède une faible affinité pour les séquences télomériques humaines (environ 10 fois moins que pour les séquences télomériques de levure), l'effet observé pourrait entraîner une diminution du recrutement de la télomérase, simulant une diminution d'expression de *CDC13* dans des levures de type sauvage.

Malgré la dégradation quasi totale des télomères, certaines cellules ( survivantes ) pourraient développer une façon de maintenir leurs télomères et d'éviter la mort cellulaire. En effet, il a été observé que des chromosomes brisés peuvent être « sauvés » par l'ajout de séquences télomériques (Kramer et Haber, 1993, Sandell et Zakian, 1993). Les télomères dégradés pourraient donc être reconnus comme des bris d'ADN et être réparés par l'ajout de séquences télomériques humaines. Des évidences ont aussi montré la présence de 2-3 copies de répétitions de 10 pb contenant au moins une copie de TTAGGG à la jonction entre les éléments X et les séquences plus centromériques (Louis et al., 1994). La matrice humaine de la télomérase de levure pourrait donc s'apparier à ces copies de TTAGGG et procéder à l'ajout de séquences télomériques humaines. La protéine de levure TBF1 (TTAGGG binding factor 1) fut identifiée pour son habileté à interagir avec les séquences télomériques de vertébrés (Liu et Tye, 1991). Il a été montré qu'elle liait aussi les répétitions TTAGGG trouvées près des éléments X (Brigati et al., 1993, Liu et Tye, 1991). Cette protéine partage des épitopes avec la protéine humaine TRF1 (telomere repeat factor 1) et il fut suggéré que TBF1 serve de protéine d'ancrage pour cibler des facteurs télomériques, comme la télomérase (Fang et Cech, 1995). Cependant, des mutations dans ce gène essentiel ne laisse aucun phénotype télomérique détectable (Brigati et al., 1993). Ainsi, une mutation de *TBF1* dans son domaine de liaison à l'ADN, dans la souche contenant des

télomères humains pourrait déterminer si l'habileté de Tbf1 à lier les répétitions (TTAGGG)<sub>n</sub> est nécessaire à la survie de ces souches.

Après le rajout de séquences télomériques humaines, des mécanismes alternatifs pourraient entraîner le rallongement et l'hétérogénéité des télomères. En effet, des éléments Y' circulaires extrachromosomiques peuvent se recombinaison sur une séquence TG<sub>1,3</sub> très courte (Horowitz et Haber, 1985). Ainsi, il est possible que des éléments circulaires constitués seulement de séquences télomériques humaines se soient formés. Ceux-ci entraîneraient un allongement et une hétérogénéité des séquences télomériques terminales humaines de levure par un mécanisme de cercle roulant (« rolling circle »). On pourrait aussi imaginer que l'extension simple-brin pourrait s'apparier avec la région double-brin en formant une boucle, créant une amorce pour la polymérisation de l'ADN. Des évidences ont montré la présence de « T-loop » chez les mammifères, alors il s'agit d'un modèle plausible (Griffith et al., 1999). Une fois les télomères ainsi allongés, d'autres événements de conversions géniques pourraient copier ces télomères sur d'autres extrémités chromosomales.

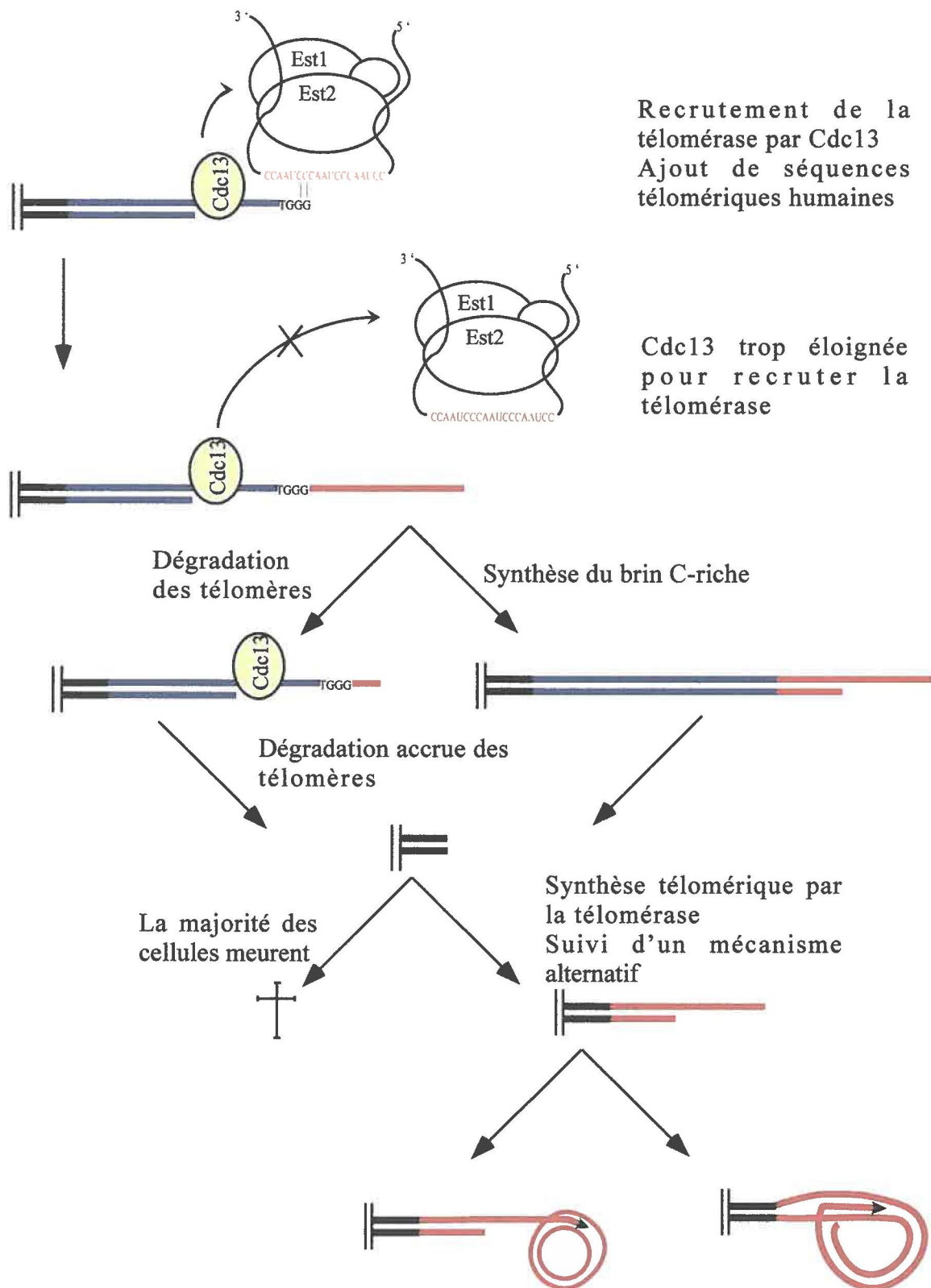


Figure 17. Modèle de viabilité à long terme des souches contenant des séquences télomériques terminales humaines

Pour valider ce modèle, il faudrait enlever le plasmide portant le gène *TLC1* avec la matrice humaine et vérifier la survie des cellules. Si celles-ci sont en mesure de vivre pour au moins 150 générations, c'est qu'elles n'ont pas besoin de ce gène pour leur survie et qu'elles ont développé un autre moyen pour répliquer leurs télomères. Le cas contraire indiquerait que la présence de la matrice ARN est nécessaire à la survie des levures et qu'un autre phénomène entraînerait l'allongement et l'hétérogénéité des télomères. Étant donné la diminution de la quantité d'ADN télomérique de levure avec le nombre de générations, on pourrait supposer que l'absence d'interaction entre la protéine Rap1 et les nouvelles séquences télomériques humaines pourrait abolir la régulation négative de la longueur des télomères et un changement de conformation provoquant un allongement non-régulé par la télomérase « humanisée ». Il serait aussi intéressant de cloner les séquences télomériques terminales des souches avant et après l'arrivée des survivants afin de vérifier la quantité d'ADN télomérique de levure (Forstemann et al., 2000). On pourrait ainsi confirmer la diminution des séquences télomériques de levure avec le nombre de génération et vérifier si une quantité minimale de ces séquences est nécessaire à la survie des cellules.

## **Étude des protéines hnRNPA1/UP1 dans des levures possédant des séquences télomériques terminales humaines**

Les souches de levures portant des séquences télomériques terminales humaines pourraient constituer un outil important pour étudier la fonction et la régulation de protéines télomériques humaines. Cette idée de « modèle » génétique nous a poussé à étudier les protéines hnRNP A1/UP1 puisque celles-ci joueraient un rôle dans la biogénèse des télomères (LaBranche et al., 1998). L'établissement d'un système modèle dans la levure n'est qu'à l'étape de préparation et les travaux furent accomplis principalement pour la protéine UP1. Ainsi, la protéine UP1 (contrairement à A1) est en mesure d'être détectée par immunobuvardage. Sa liaison spécifique à l'oligo ts10 semble indiquer qu'elle a la capacité de lier des séquences télomériques humaines. Cependant, UP1 ne semble avoir aucun effet aux télomères humains chez la levure. L'ajout d'un signal de localisation nucléaire (NLS) n'entraîne aucun changement à ce niveau. *In vivo*, les protéines A1/UP1 promouvoient l'allongement des télomères de cellules de souris (LaBranche et al., 1998), possiblement en recrutant la télomérase. Ainsi, on aurait pu s'attendre à un allongement des télomères dans les souches de levure portant des séquences télomériques humaines. Cependant, il est possible que le NLS ne soit pas fonctionnel et que la protéine ne se retrouve pas au noyau, empêchant sa localisation aux extrémités télomériques *in vivo*. Une



immunoprécipitation de la chromatine pourrait confirmer cette dernière option. Une absence d'interaction de ces protéines aux télomères expliquerait l'absence d'effet lors de leur expression. A1/UP1 pourraient aussi être incapables de recruter la télomérase aux télomères dû à un changement de conformation dans la télomérase ou à une compétition avec d'autres protéines de levure déjà présentes aux télomères. Il serait aussi intéressant de vérifier si une croissance continue des souches de levure portant des séquences télomériques humaines en présence d'UP1 permettrait d'augmenter le nombre de génération avant la sénescence.

Le fait qu'A1 ne puisse être détectée par immunobuvardage pourrait être dû à un niveau d'expression trop faible pour la détection. Cela pourrait aussi être causé par une grande instabilité de la protéine dans la levure, menant à sa dégradation complète. Pour y remédier, nous pourrions ajouter une étiquette (Myc, Tag, GST ...) en C- ou en N-terminal de la protéine. En effet, il a été remarqué qu'une étiquette est essentielle à la stabilité de certaines protéines exprimées chez la levure (communications personnelles, Chantal Autexier). L'étude de liaison de A1 à ts10 et son effet aux télomères pourrait ensuite être réalisée.

### **Analyse de complémentation des sous-unités de la télomérase humaine et de levure**

Les études de complémentation entre les sous-unités des télomérases de levure et humaine se sont avérées négatives. Bachand et al. ont montré qu'il était possible d'obtenir une télomérase humaine active à partir d'un lysat de levure co-exprimant GST-hTERT et hTR (Bachand et Autexier, 1999). En exprimant hTR et GST-hTERT dans les levures contenant des séquences télomériques humaines, ces sous-unités auraient pu agir aux extrémités télomériques et maintenir ainsi leur survie. Cependant, ces deux sous-unités ne peuvent maintenir la survie des souches portant des séquences télomériques terminales humaines (TLC1H). En effet, les cellules TLC1H meurent plus tôt (30-50 gen) que les cellules TLC1WT (~70 gen). La présence de télomères déjà courts (TRFs d'environ 1 kb) dans la souche TLC1H pourrait probablement causer cette différence de viabilité. En effet, lors du vieillissement et de la dégradation des télomères, la longueur critique pour la survie serait atteinte plus tôt que pour les cellules TLC1WT (TRFs d'environ 1,3 kb). Si les sous-unités de la télomérase humaine avaient été en mesure de compléter la perte des sous-unités de levure, on aurait pu observer une viabilité cellulaire pour au moins 150 générations. L'absence de complémentarité n'est pas due à un manque d'expression de hTERT ou une absence d'activité puisque ces données furent vérifiées et se sont avérées positives (résultats fournis par François Bachand et Chantal Autexier). Comme des interactions précises entre les sous-unités catalytiques et l'ARN sont nécessaires à l'activité

télomérasique, on pouvait anticiper que des cellules n'exprimant que les sous-unités Est2 et hTR ou hTERT et TLC1 (humanisé ou non) ne puisse survivre (Lai et al., 2001). Ces résultats suggèrent donc que la télomérase humaine est incapable d'allonger les télomères humains présents dans ces souches de levures. Cependant, il est possible que ce manque de complémentation ne soit dû qu'à un problème au niveau du recrutement de la télomérase humaine aux séquences télomériques humaines. Pour répondre à cette question, il faudrait créer une fusion du domaine de liaison à l'ADN de Cdc13 avec hTERT. Cette fusion pourrait forcer le recrutement de la télomérase humaine aux séquences télomériques humaines et ainsi assurer le maintien de la survie de ces souches. En effet, le DBD<sub>CDC13</sub> fut déjà utilisé en fusion avec une des sous-unités de la télomérase de levure afin de provoquer le recrutement de la télomérase aux télomères (Evans et Lundblad, 1999, Hughes et al., 2000, Pennock et al., 2001). La délétion de *CDC13* dans le génome pourrait aussi augmenter les chances de complémentation étant donné un manque de compétition avec la protéine endogène.

## **5. REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr. Raymund Wellinger, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour son soutien tout au long de ma maîtrise. Je remercie également Dr. Benoît Chabot et Dr. Benoît Cousineau d'avoir accepté de composer le jury de mon mémoire. Je veux aussi remercier tous les membres du laboratoire pour leurs judicieux conseils. Un merci tout spécial aux personnes qui me sont chères et qui ont su m'appuyer tout au long de ma maîtrise. Finalement, je remercie le FCAR-FRSQ-Santé pour son appui financier pendant mes études graduées.

## 6. LISTE DES RÉFÉRENCES

Abdul-Manan, N., O'Malley, S. M. & Williams, K. R. Origins of binding specificity of the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein. *Biochemistry* **35**, 3545-3554 (1996).

Adams Martin, A., Dionne, I., Wellinger, R. J. & Holm, C. The function of DNA polymerase  $\alpha$  at telomeric G tails is important for telomere homeostasis, *Mol Cell Biol* **20**, 786-796 (2000).

Aparicio, O. M., Billington, B. L. & Gottschling, D. E. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* **66**, 1279-1287 (1991).

Autexier, C. & Greider, C. W. Functional reconstitution of wild-type and mutant Tetrahymena telomerase, *Genes Dev* **8**, 563-575 (1994).

Autexier, C. & Greider, C. W. Boundary elements of the Tetrahymena telomerase RNA template and alignment domains, *Genes Dev* **9**, 2227-2239 (1995).

Bachand, F. & Autexier, C. Functional reconstitution of human telomerase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**, 38027-38031 (1999).

Baldino, F., Jr., Chesselet, M. F. & Lewis, M. E. High-resolution in situ hybridization histochemistry. *Methods Enzymol* **168**, 761-777 (1989).

Beeler, T., Gable, K., Zhao, C. & Dunn, T. A novel protein, CSG2p, is required for Ca<sup>2+</sup> regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 7279-7284 (1994).

Berman, J., Tachibana, C. Y. & Tye, B. K. Identification of a telomere-binding activity from yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 3713-3717 (1986).

Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P. & de Lange, T. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J* **16**, 1785-1794 (1997).

Bianchi, A., Stansel, R. M., Fairall, L., Griffith, J. D., Rhodes, D. & de Lange, T. TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *EMBO J* **18**, 5735-5744 (1999).

Biessmann, H., Champion, L. E., O'Hair, M., Ikenaga, K., Kasravi, B. & Mason, J. M. Frequent transpositions of *Drosophila melanogaster* HeT-A transposable elements to receding chromosome ends. *EMBO J* **11**, 4459-4469 (1992).

Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C. E., Laroche, T. & Gilson, E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* **17**, 236-239 (1997).

Blackburn, E. H. Telomeres. *Trends Biochem Sci* **16**, 378-381 (1991).

Blackburn, E. H. Telomerases. *Annu Rev Biochem* **61**, 113-129 (1992).

Blasco, M. A., Funk, W., Villeponteau, B. & Greider, C. W. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* **269**, 1267-1270 (1995).

Blasco, M. A., Lee, H. W., Rizen, M., Hanahan, D., DePinho, R. & Greider, C. W. Mouse models for the study of telomerase. *Ciba Found Symp* **211**, 160-170 (1997).

Boeke, J. D., LaCroute, F. & Fink, G. R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**, 345-346 (1984).

Boulton, S. J. & Jackson, S. P. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res* **24**, 4639-4648 (1996).

Bourgain, F. M. & Katinka, M. D. Telomeres inhibit end to end fusion and enhance maintenance of linear DNA molecules injected into the *Paramecium primaurelia* macronucleus. *Nucleic Acids Res* **19**, 1541-1547 (1991).

Bourns, B. D., Alexander, M. K., Smith, A. M. & Zakian, V. A. Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres in vivo. *Mol Cell Biol* **18**, 5600-5608 (1998).

Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. & Boeke, J. D. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132 (1998).



Brigati, C., Kurtz, S., Balderes, D., Vidali, G. & Shore, D. An essential yeast gene encoding a TTAGGG repeat-binding protein. *Mol Cell Biol* **13**, 1306-1314 (1993).

Broccoli, D., Chong, L., Oelmann, S., Fernald, A. A., Marziliano, N., van Steensel, B., Kipling, D., Le Beau, M. M. & de Lange, T. Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains. *Hum Mol Genet* **6**, 69-76 (1997).

Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bachetti, S. & Reddel, R. R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* **14**, 4240-4248 (1995).

Bryan, T. M., Sperger, J. M., Chapman, K. B. & Cech, T. R. Telomerase reverse transcriptase genes identified in *Tetrahymena thermophila* and *Oxytricha trifallax*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8479-8484 (1998).

Burd, C. G. & Dreyfuss, G. RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high- affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO J* **13**, 1197-1204 (1994).

Caceres, J. F., Stamm, S., Helfman, D. M. & Krainer, A. R. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* **265**, 1706-1709 (1994).

Chabot, B., Blanchette, M., Lapierre, I. & La Branche, H. An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Mol Cell Biol* **17**, 1776-1786 (1997).

Chadeneau, C., Siegel, P., Harley, C. B., Muller, W. J. & Bacchetti, S. Telomerase activity in normal and malignant murine tissues. *Oncogene* **11**, 893-898 (1995).

Chan, C. S. & Tye, B. K. A family of *Saccharomyces cerevisiae* repetitive autonomously replicating sequences that have very similar genomic environments. *J Mol Biol* **168**, 505-523 (1983).

Chapon, C., Cech, T. R. & Zaug, A. J. Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *RNA* **3**, 1337-1351 (1997).

Chen, J.-L., Blasco, M. A. & Greider, C. W., Secondary structure of vertebrate telomerase RNA, *Cell* **100**, 503-514 (2000).

Chen, Q., Ijima, A. & Greider, C. W. Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events. *Mol Cell Biol* **21**, 1819-1827 (2001).

Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P. & de Lange, T. A human telomeric protein. *Science* **270**, 1663-1667 (1995).

Chung, H. M., Shea, C., Fields, S., Taub, R. N., Van der Ploeg, L. H. & Tse, D. B. Architectural organization in the interphase nucleus of the protozoan *Trypanosoma brucei*: location of telomeres and mini-chromosomes. *EMBO J* **9**, 2611-2619 (1990).

Cobianchi, F., SenGupta, D. N., Zmudzka, B. Z. & Wilson, S. H. Structure of rodent helix-destabilizing protein revealed by cDNA cloning. *J Biol Chem* **261**, 3536-3543 (1986).

Cockell, M., Palladino, F., Laroche, T., Kyrion, G., Liu, C., Lustig, A. J. & Gasser, S. M. The carboxy termini of Sir4 and Rap1 affect Sir3 localization: evidence for a multicomponent complex required for yeast telomeric silencing. *J Cell Biol* **129**, 909-924 (1995).

Cohn, M. & Blackburn, E. H. Telomerase in yeast. *Science* **269**, 396-400. (1995).

Conrad, M. N., Wright, J. H., Wolf, A. J. & Zakian, V. A. RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**, 739-750 (1990).

Cooper, J. P., Nimmo, E. R., Allshire, R. C. & Cech, T. R. Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* **385**, 744-747 (1997).

Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B. & Bacchetti, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* **11**, 1921-1929 (1992).

Counter, C. M., Meyerson, M., Eaton, E. N. & Weinberg, R. A. The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9202-9207 (1997).

Dallaire, F., Dupuis, S., Fiset, S. & Chabot, B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and UP1 protect mammalian telomeric repeats and modulate telomere replication in vitro. *J Biol Chem* **275**, 14509-14516 (2000).

Dandjinou, A. T., Dionne, I., Gravel, S., LeBel, C., Parenteau, J. & Wellinger, R. J. Cytological and functional aspects of telomere maintenance. *Histol Histopathol* **14**, 517-524 (1999).

Denhardt, D. T. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **23**, 641-646 (1966).

Dez, C., Henras, A., Faucon, B., Lafontaine, D. L., Caizergues-Ferrer, M. & Henry, Y. Stable expression in yeast of the mature form of human telomerase RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar RNP proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p. *Nucleic Acids Res* **29**, 598-603 (2001).

Diede, S. J. & Gottschling, D. E. Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* **99**, 723-733 (1999).

Dingwall, C. & Laskey, R. A. Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* **16**, 478-481 (1991).

Dionne, I. & Wellinger, R. J. Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13902-13907 (1996).

Dresser, M. E. & Giroux, C. N. Meiotic chromosome behavior in spread preparations of yeast. *J Cell Biol* **106**, 567-573 (1988).

Drouin, R., Lemieux, N. & Richer, C. L. Analysis of DNA replication during S-phase by means of dynamic chromosome banding at high resolution. *Chromosoma* **99**, 273-280 (1990).

Dunn, B., Szauter, P., Pardue, M. L. & Szostak, J. W. Transfer of yeast telomeres to linear plasmids by recombination. *Cell* **39**, 191-201 (1984).

Erlitzki, R. & Fry, M. Sequence-specific binding protein of single-stranded and unimolecular quadruplex telomeric DNA from rat hepatocytes. *J Biol Chem* **272**, 15881-15890 (1997).

Evans, S. K. & Lundblad, V. Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* **286**, 117-120 (1999).

Fang, G. & Cech, T. R. The beta subunit of Oxytricha telomere-binding protein promotes G- quartet formation by telomeric DNA. *Cell* **74**, 875-885 (1993).

Fang, G. & Cech, T. R. *Telomeres*, éd. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

Feldmann, H., Driller, L., Meier, B., Mages, G., Kellermann, J. & Winnacker, E. L. HDF2, the second subunit of the Ku homologue from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**, 27765-27769 (1996).

Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J. & et al. The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236-1241 (1995).

Ferguson, B. M. & Fangman, W. L. A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell* **68**, 333-339 (1992).

Fitzgerald, M. S., Riha, K., Gao, F., Ren, S., McKnight, T. D. & Shippen, D. E. Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from Arabidopsis inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14813-14818 (1999).

Foe, V. E. & Alberts, B. M. Reversible chromosome condensation induced in *Drosophila* embryos by anoxia: visualization of interphase nuclear organization. *J Cell Biol* **100**, 1623-1636 (1985).

Forstemann, K., Hoss, M. & Lingner, J. Telomerase-dependent repeat divergence at the 3' ends of yeast telomeres. *Nucleic Acids Res* **28**, 2690-2694 (2000).



Froelich-Ammon, S. J., Dickinson, B. A., Bevilacqua, J. M., Schultz, S. C. & Cech, T. R. Modulation of telomerase activity by telomere DNA-binding proteins in *Oxytricha*. *Genes Dev* **12**, 1504-1514 (1998).

Fu, Y., Weissbach, L., Plant, P. W., Oddoux, C., Cao, Y., Liang, T. J., Roy, S. N., Redman, C. M. & Grieninger, G. Carboxy-terminal-extended variant of the human fibrinogen alpha subunit: a novel exon conferring marked homology to beta and gamma subunits. *Biochemistry* **31**, 11968-11972 (1992).

Furuse, M., Nagase, Y., Tsubouchi, H., Murakami-Murofushi, K., Shibata, T. & Ohta, K. Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J* **17**, 6412-6425 (1998).

Ganot, P., Caizergues-Ferrer, M. & Kiss, T. The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. *Genes Dev* **11**, 941-956 (1997).

Garvik, B., Carson, M. & Hartwell, L. Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9. *Mol Cell Biol* **15**, 6128-6138 (1995).

Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. & Schiestl, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 1425 (1992).

Gilson, E., Laroche, T. & Gasser, S. M. Telomeres and the functional architecture of nucleus. *Trends in Cell Biology* **3**, 128-143 (1993a).

Gilson, E., Roberge, M., Giraldo, R., Rhodes, D. & Gasser, S. M. Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J Mol Biol* **231**, 293-310 (1993b).

Gottschling, D. E. Telomere-proximal DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is refractory to methyltransferase activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4062-4065 (1992).

Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L. & Zakian, V. A. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**, 751-762 (1990).

Gottschling, D. E. & Cech, T. R. Chromatin structure of the molecular ends of *Oxytricha* macronuclear DNA: phased nucleosomes and a telomeric complex. *Cell* **38**, 501-510 (1984).

Gottschling, D. E. & Zakian, V. A. Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell* **47**, 195-205 (1986).

Grandin, N., Damon, C. & Charbonneau, M. Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *EMBO J* **20**, 1173-1183 (2001).

Grandin, N., Reed, S. I. & Charbonneau, M. Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev* **11**, 512-527 (1997).

Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P. & Wellinger, R. J. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**, 741-744 (1998).

Greenberg, R. A., Allsopp, R. C., Chin, L., Morin, G. B. & DePinho, R. A. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* **16**, 1723-1730 (1998).

Greider, C. W. Telomeres. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 444-451 (1991).

Greider, C. W. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* **65**, 337-365 (1996).

Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405-413 (1985).

Greider, C. W. & Blackburn, E. H. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**, 887-898 (1987).

Greider, C. W. & Blackburn, E. H. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**, 331-337 (1989).

Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am* **274**, 92-97 (1996).

Griffith, J., Bianchi, A. & de Lange, T. TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *J Mol Biol* **278**, 79-88 (1998).

Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H. & de Lange, T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-514 (1999).

Hardy, C. F., Sussel, L. & Shore, D. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev* **6**, 801-814 (1992).

Harley, C. B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* **256**, 271-282 (1991).

Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460 (1990).

Harley, C. B., Kim, N. W., Prowse, K. R., Weinrich, S. L., Hirsch, K. S., West, M. D., Bacchetti, S., Hirte, H. W., Counter, C. M., Greider, C. W. & et al. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**, 307-315 (1994).

Harley, C. B. & Villeponteau, B. Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 249-255 (1995).

Harrington, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D. S., Mar, V., Bass, M. B. & Robinson, M. O. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev* **11**, 3109-3115 (1997).

Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K. & Allshire, R. C. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* **346**, 866-868 (1990).

Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M. & Grunstein, M. Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**, 583-592 (1995).

Henderson, E. R. & Blackburn, E. H. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol Cell Biol* **9**, 345-348 (1989).

Henikoff, S. & Eghtedarzadeh, M. K. Conserved arrangement of nested genes at the *Drosophila* Gart locus. *Genetics* **117**, 711-725 (1987).

Henning, K. A., Moskowitz, N., Ashlock, M. A. & Liu, P. P. Humanizing the yeast telomerase template. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5667-5671 (1998).

Herrick, G. & Alberts, B. Nucleic acid helix-coil transitions mediated by helix-unwinding proteins from calf thymus. *J Biol Chem* **251**, 2133-2141 (1976).

Horowitz, H. & Haber, J. E. Identification of autonomously replicating circular subtelomeric Y' elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5**, 2369-2380 (1985).

Horowitz, H., Thorburn, P. & Haber, J. E. Rearrangements of highly polymorphic regions near telomeres of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **4**, 2509-2517 (1984).

Hsu, H. L., Gilley, D., Galande, S. A., Hande, M. P., Allen, B., Kim, S. H., Li, G. C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T. & Chen, D. J. Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev* **14**, 2807-2812 (2000).

Huberman, J. A., Spotila, L. D., Nawotka, K. A., el-Assouli, S. M. & Davis, L. R. The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid. *Cell* **51**, 473-481 (1987).

Hughes, T. R., Evans, S. K., Weilbaecher, R. G. & Lundblad, V. The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr Biol* **10**, 809-812 (2000).

Ishikawa, F., Matunis, M. J., Dreyfuss, G. & Cech, T. R. Nuclear proteins that bind the pre-mRNA 3' splice site sequence r(UUAG/G) and the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG)<sub>n</sub>. *Mol Cell Biol* **13**, 4301-4310 (1993).

Izaurrealde, E. & Adam, S. Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *RNA* **4**, 351-364 (1998).

Jackson, S. P. & Jeggo, P. A. DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem Sci* **20**, 412-415 (1995).

Jager, D. & Philippsen, P. Many yeast chromosomes lack the telomere-specific Y' sequence. *Mol Cell Biol* **9**, 5754-5757 (1989).



Kamma, H., Portman, D. S. & Dreyfuss, G. Cell type-specific expression of hnRNP proteins. *Exp Cell Res* **221**, 187-196 (1995).

Kayne, P. S., Kim, U. J., Han, M., Mullen, J. R., Yoshizaki, F. & Grunstein, M. Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* **55**, 27-39 (1988).

Kiledjian, M. & Dreyfuss, G. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* **11**, 2655-2664 (1992).

Kilian, A., Bowtell, D. D., Abud, H. E., Hime, G. R., Venter, D. J., Keese, P. K., Duncan, E. L., Reddel, R. R. & Jefferson, R. A. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* **6**, 2011-2019 (1997).

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. & Shay, J. W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011-2015 (1994).

Kim, S. H., Kaminker, P. & Campisi, J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* **23**, 405-412 (1999).

Kipling, D. & Cooke, H. J. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**, 400-402 (1990).

Klein, F., Laroche, T., Cardenas, M. E., Hofmann, J. F., Schweizer, D. & Gasser, S. M. Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *J Cell Biol* **117**, 935-948 (1992).

Klobutcher, L. A., Swanton, M. T., Donini, P. & Prescott, D. M. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 3015-3019 (1981).

Konig, P., Giraldo, R., Chapman, L. & Rhodes, D. The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell* **85**, 125-136 (1996).

Kramer, K. M. & Haber, J. E. New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG1-3 repeats. *Genes Dev* **7**, 2345-2356 (1993).

Kyrion, G., Liu, K., Liu, C. & Lustig, A. J. RAP1 and telomere structure regulate telomere position effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **7**, 1146-1159 (1993).

LaBranche, H., Dupuis, S., Ben-David, Y., Bani, M. R., Wellinger, R. J. & Chabot, B. Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nat Genet* **19**, 199-202 (1998).

Lai, C. K., Mitchell, J. R. & Collins, K. RNA Binding Domain of Telomerase Reverse Transcriptase. *Mol Cell Biol* **21**, 990-1000 (2001).

Laroche, T., Martin, S. G., Gotta, M., Gorham, H. C., Pryde, F. E., Louis, E. J. & Gasser, S. M. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol* **8**, 653-656 (1998).

Lendvay, T. S., Morris, D. K., Sah, J., Balasubramanian, B. & Lundblad, V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* **144**, 1399-1412 (1996).

LeStourgeon, W. M., Beyer, A. L., Christensen, M. E., Walker, B. W., Poupore, S. M. & Daniels, L. P. The packaging proteins of core hnRNP particles and the maintenance of proliferative cell states. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **42**, 885-898 (1978).

Levis, R. W. Viable deletions of a telomere from a *Drosophila* chromosome. *Cell* **58**, 791-801 (1989).

Lieber, M. R., Grawunder, U., Wu, X. & Yaneva, M. Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 99-104 (1997).

Lima-de-Faria, A. & Mitelman, F. The chromosome territory of human oncogenes. *Biosci Rep* **6**, 349-354 (1986).

Lin, J. J. & Zakian, V. A. An in vitro assay for *Saccharomyces* telomerase requires EST1. *Cell* **81**, 1127-1135 (1995).

Lin, J. J. & Zakian, V. A. The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA- binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13760-13765 (1996).

Lingner, J. & Cech, T. R. Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10712-10717 (1996).

Lingner, J., Cech, T. R., Hughes, T. R. & Lundblad, V. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11190-11195 (1997a).

Lingner, J., Cooper, J. P. & Cech, T. R. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* **269**, 1533-1534 (1995).

Lingner, J., Hendrick, L. L. & Cech, T. R. Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev* **8**, 1984-1998 (1994).

Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V. & Cech, T. R. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**, 561-567 (1997b).

Liu, Z. P. & Tye, B. K. A yeast protein that binds to vertebrate telomeres and conserved yeast telomeric junctions. *Genes Dev* 5, 49-59 (1991).

Louis, E. J. The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1553-1573 (1995).

Louis, E. J. & Haber, J. E. The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics* 124, 533-545 (1990).

Louis, E. J., Naumova, E. S., Lee, A., Naumov, G. & Haber, J. E. The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics* 136, 789-802 (1994).

Lowell, J. E. & Pillus, L. Telomere tales: chromatin, telomerase and telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Life Sci* 54, 32-49 (1998).

Luderus, M. E., van Steensel, B., Chong, L., Sibon, O. C., Cremers, F. F. & de Lange, T. Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol* **135**, 867-881 (1996).

Lundblad, V. DNA ends: maintenance of chromosome termini versus repair of double strand breaks. *Mutat Res* **451**, 227-240 (2000).

Lundblad, V. & Blackburn, E. H. RNA-dependent polymerase motifs in EST1: tentative identification of a protein component of an essential yeast telomerase. *Cell* **60**, 529-530 (1990).

Lundblad, V. & Blackburn, E. H. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* **73**, 347-360 (1993).

Lundblad, V. & Szostak, J. W. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**, 633-643 (1989).

Lustig, A. J. Mechanisms of silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 233-239 (1998).

Makarov, V. L., Hirose, Y. & Langmore, J. P. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* **88**, 657-666 (1997).

Mantell, L. L. & Greider, C. W. Telomerase activity in germline and embryonic cells of *Xenopus*. *EMBO J* **13**, 3211-3217 (1994).

Manuelidis, L. & Borden, J. Reproducible compartmentalization of individual chromosome domains in human CNS cells revealed by in situ hybridization and three-dimensional reconstruction. *Chromosoma* **96**, 397-410 (1988).

Marcand, S., Gilson, E. & Shore, D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* **275**, 986-990 (1997).

Marshall, M., Mahoney, D., Rose, A., Hicks, J. B. & Broach, J. R. Functional domains of SIR4, a gene required for position effect regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**, 4441-4452 (1987).



Martin-Rivera, L., Herrera, E., Albar, J. P. & Blasco, M. A. Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10471-10476 (1998).

Mayeda, A. & Krainer, A. R. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* **68**, 365-375 (1992).

Mayeda, A., Munroe, S. H., Xu, R. M. & Krainer, A. R. Distinct functions of the closely related tandem RNA-recognition motifs of hnRNP A1. *Rna* **4**, 1111-1123 (1998).

McClintock, B. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **25**, 405-416 (1939).

McEachern, M. J. & Blackburn, E. H. Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations. *Nature* **376**, 403-409 (1995).

McEachern, M. J. & Blackburn, E. H. Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase. *Genes Dev* **10**, 1822-1834 (1996).

McElligott, R. & Wellinger, R. J. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* **16**, 3705-3714 (1997).

McKay, S. J. & Cooke, H. hnRNP A2/B1 binds specifically to single stranded vertebrate telomeric repeat TTAGGG<sub>n</sub>. *Nucleic Acids Research* **20**, 6461-6464 (1992).

Melek, M., Davis, B. T. & Shippen, D. E. Oligonucleotides complementary to the *Oxytricha nova* telomerase RNA delineate the template domain and uncover a novel mode of primer utilization. *Mol Cell Biol* **14**, 7827-7838 (1994).

Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D. A. & Weinberg, R. A. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**, 785-795 (1997).

Meyne, J., Ratliff, R. L. & Moyzis, R. K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7049-7053 (1989).

Michael, W. M., Choi, M. & Dreyfuss, G. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature- dependent nuclear protein export pathway. *Cell* **83**, 415-422 (1995).

Milne, G. T., Jin, S., Shannon, K. B. & Weaver, D. T. Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 4189-4198 (1996).

Mitchell, J. R. & Collins, K. Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell* **6**, 361-371 (2000).

Mitchell, J. R., Wood, E. & Collins, K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402**, 551-555 (1999).

Morin, G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**, 521-529 (1989).

Muller, H. J. The remaking of chromosomes. *The Collecting Netwoods Hole* **13**, 181-198 (1938).

Murray, A. W., Claus, T. E. & Szostak, J. W. Characterization of two telomeric DNA processing reactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**, 4642-4650 (1988).

Nakamura, T. M., Cooper, J. P. & Cech, T. R. Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science* **282**, 493-496 (1998).

Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B. & Cech, T. R. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**, 955-959 (1997).

Ni, J., Samarsky, D. A., Liu, B., Ferbeyre, G., Cedergren, R. & Fournier, M. J. SnoRNAs as tools for RNA cleavage and modification. *Nucleic Acids Symp Ser* **36**, 61-63 (1997).

Nugent, C. I., Bosco, G., Ross, L. O., Evans, S. K., Salinger, A. P., Moore, J. K., Haber, J. E. & Lundblad, V. Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* **8**, 657-660 (1998).

Nugent, C. I., Hughes, T. R., Lue, N. F. & Lundblad, V. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**, 249-252 (1996).

Nugent, C. I. & Lundblad, V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* **12**, 1073-1085 (1998).

Oka, Y., Shiota, S., Nakai, S., Nishida, Y. & Okubo, S. Inverted terminal repeat sequence in the macronuclear DNA of *Stylonychia pustulata*. *Gene* **10**, 301-306 (1980).

Olovnikov, A. M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* **41**, 181-190 (1973).

Olovnikov, A. M. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol* **31**, 443-448 (1996).

Pandolfo, M., Valentini, O., Biamonti, G., Morandi, C. & Riva, S. Single stranded DNA binding proteins derive from hnRNP proteins by proteolysis in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **13**, 6577-6590 (1985).

Paques, F. & Haber, J. E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 349-404 (1999).

Pennock, E., Buckley, K. & Lundblad, V. Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* **104**, 387-396 (2001).

Peterson, S. E., Stellwagen, A. E., Diede, S. J., Singer, M. S., Haimberger, Z. W., Johnson, C. O., Tzoneva, M. & Gottschling, D. E. The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat Genet* **27**, 64-67 (2001).

Pinol-Roma, S. & Dreyfuss, G. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **355**, 730-732 (1992).

Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. & Tordo, N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* **8**, 3867-3874 (1989).

Polotnianka, R. M., Li, J. & Lustig, A. J. The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr Biol* **8**, 831-834 (1998).

Prescott, J. & Blackburn, E. H. Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes Dev* **11**, 2790-2800 (1997a).

Prescott, J. & Blackburn, E. H. Telomerase RNA mutations in *Saccharomyces cerevisiae* alter telomerase action and reveal nonprocessivity in vivo and in vitro. *Genes Dev* **11**, 528-540 (1997b).

Price, C. M. & Cech, T. R. Telomeric DNA-protein interactions of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Genes Dev* **1**, 783-793 (1987).

Prowse, K. R., Avilion, A. A. & Greider, C. W. Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1493-1497 (1993).

Prowse, K. R. & Greider, C. W. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4818-4822 (1995).

Pryde, F. E., Gorham, H. C. & Louis, E. J. Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 822-828 (1997).

Pryde, F. E. & Louis, E. J. Limitations of silencing at native yeast telomeres. *Embo J* **18**, 2538-2550 (1999).

Rasmussen, S. W. & Holm, P. B. Mechanics of meiosis. *Hereditas* **93**, 187-216 (1980).

Rawlins, D. J. & Shaw, P. J. Localization of ribosomal and telomeric DNA sequences in intact plant nuclei by in-situ hybridization and three-dimensional optical microscopy. *J Microsc* **157**, 83-89 (1990).



Renauld, H., Aparicio, O. M., Zierath, P. D., Billington, B. L., Chhablani, S. K. & Gottschling, D. E. Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and by SIR3 dosage. *Genes Dev* 7, 1133-1145 (1993).

Riva, S., Morandi, C., Tsoulfas, P., Pandolfo, M., Biamonti, G., Merrill, B., Williams, K. R., Multhaup, G., Beyreuther, K., Werr, H. & et al. Mammalian single-stranded DNA binding protein UP I is derived from the hnRNP core protein A1. *EMBO J* 5, 2267-2273 (1986).

Rogan, E. M., Bryan, T. M., Hukku, B., Maclean, K., Chang, A. C., Moy, E. L., Englezou, A., Warneford, S. G., Dalla-Pozza, L. & Reddel, R. R. Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15, 4745-4753 (1995).

Romero, D. P. & Blackburn, E. H. A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell* 67, 343-353 (1991).

Rose, M. D., Winston, F. & Hieter, P. *Methods in yeast genetics; a laboratory course manual*, éd. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990).

Roth, D. B., Lindahl, T. & Gellert, M. Repair and recombination. How to make ends meet. *Curr Biol* **5**, 496-499 (1995).

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular cloning; a laboratory manual*, 2<sup>è</sup> éd. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Sandell, L. L. & Zakian, V. A. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**, 729-739 (1993).

Schwartz, H. S., Butler, M. G., Jenkins, R. B., Miller, D. A. & Moses, H. L. Telomeric associations and consistent growth factor overexpression detected in giant cell tumor of bone. *Cancer Genet Cytogenet* **56**, 263-276 (1991).

Shampay, J., Szostak, J. W. & Blackburn, E. H. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**, 154-157 (1984).

Shay, J. W. & Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* **33**, 787-791 (1997).

Sheen, F. M. & Levis, R. W. Transposition of the LINE-like retrotransposon TART to *Drosophila* chromosome termini. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12510-12514 (1994).

Shippen-Lentz, D. & Blackburn, E. H. Telomere terminal transferase activity from *Euplotes crassus* adds large numbers of TTTTGGGG repeats onto telomeric primers. *Mol Cell Biol* **9**, 2761-2764 (1989).

Shippen-Lentz, D. & Blackburn, E. H. Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* **247**, 546-552 (1990).

Sikorski, R. S. & Hieter, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27 (1989).

Singer, M. S. & Gottschling, D. E. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**, 404-409 (1994).

Siomi, H. & Dreyfuss, G. A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol* **129**, 551-560 (1995).

Smith, S. & de Lange, T. Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes. *J Cell Sci* **112**, 3649-3656 (1999).

Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G. & de Lange, T. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* **20**, 1659-1668 (2000).

Starling, J. A., Maule, J., Hastie, N. D. & Allshire, R. C. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res* **18**, 6881-6888 (1990).

Steiner, B. R., Hidaka, K. & Fletcher, B. Association of the Est1 protein with telomerase activity in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2817-2821 (1996).

Szostak, J. W. & Blackburn, E. H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* **29**, 245-255 (1982).

Teng, C. S., Chang, J., McCowan, B. & Zakian, A. V. Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50p-dependent, Rif-inhibited recombinational process. *Mol Cell* **6**, 947-952 (2000).

Teng, S. C. & Zakian, V. A. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 8083-8093 (1999).

Thompson, J. S., Ling, X. & Grunstein, M. Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* **369**, 245-247 (1994).

Tollervey, D. & Kiss, T. Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 337-342 (1997).

Usui, T., Ohta, T., Oshiumi, H., Tomizawa, J., Ogawa, H. & Ogawa, T. Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* **95**, 705-716 (1998).

Valentini, O., Biamonti, G., Pandolfo, M., Morandi, C. & Riva, S. Mammalian single-stranded DNA binding proteins and heterogeneous nuclear RNA proteins have common antigenic determinants. *Nucleic Acids Res* **13**, 337-346 (1985).

van Steensel, B. & de Lange, T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**, 740-743 (1997).

van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**, 401-413 (1998).

Virta-Pearlman, V., Morris, D. K. & Lundblad, V. Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev* **10**, 3094-3104 (1996).

Vourc'h, C., Taruscio, D., Boyle, A. L. & Ward, D. C. Cell cycle-dependent distribution of telomeres, centromeres, and chromosome-specific subsatellite domains in the interphase nucleus of mouse lymphocytes. *Exp Cell Res* **205**, 142-151 (1993).

Walmsley, R. W., Chan, C. S., Tye, B. K. & Petes, T. D. Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes. *Nature* **310**, 157-160 (1984).

Watson, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* **239**, 197-201 (1972).

Weaver, D. T. What to do at an end: DNA double-strand-break repair. *Trends Genet* **11**, 388-392 (1995).

Weinert, T. DNA damage checkpoints update: getting molecular. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 185-193 (1998).

Wellinger, R. J., Ethier, K., Labrecque, P. & Zakian, V. A. Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* **85**, 423-433 (1996).

Wellinger, R. J. & Sen, D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer* **33**, 735-749 (1997).

Wellinger, R. J., Wolf, A. J. & Zakian, V. A. Origin activation and formation of single-strand TG<sub>1-3</sub> tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol Cell Biol* **13**, 4057-4065 (1993a).

Wellinger, R. J., Wolf, A. J. & Zakian, V. A. *Saccharomyces* Telomeres acquire single-strand TG<sub>1-3</sub> tails in late S phase. *Cell* **72**, 51-60 (1993b).

Wotton, D. & Shore, D. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**, 748-760 (1997).

Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D. & Shay, J. W. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* **11**, 2801-2809 (1997).

Xiong, Y. & Eickbush, T. H. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J* **9**, 3353-3362 (1990).

Yang, X., Bani, M. R., Lu, S. J., Rowan, S., Ben-David, Y. & Chabot, B. The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoparticles modulate 5' splice site selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6924-6928 (1994).

Yu, G. L. & Blackburn, E. H. Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in *Tetrahymena*. *Cell* **67**, 823-832 (1991).



Zahler, A. M. & Prescott, D. M. Telomere terminal transferase activity in the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova* and a model for replication of the ends of linear DNA molecules. *Nucleic Acids Res* **16**, 6953-6972 (1988).

Zakian, V. A. Structure and function of telomeres. *Annual Review of Genetics* **23**, 579-604 (1989).

Zakian, V. A. Telomeres: beginning to understand the end. *Science* **270**, 1601-1607 (1995).

Zakian, V. A. Structure, function, and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Annu Rev Genet* **30**, 141-172 (1996).

Zakian, V. A. & Blanton, H. M. Distribution of telomere-associated sequences on natural chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**, 2257-2260. (1988).

Zakian, V. A. & Scott, J. F. Construction, replication, and chromatin structure of TRP1 RI circle, a multiple-copy synthetic plasmid derived from *Saccharomyces cerevisiae* chromosomal DNA. *Mol Cell Biol* **2**, 221-232 (1982).

Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R.,  
Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Gene expression profiles in normal and cancer cells.  
*Science* **276**, 1268-1272 (1997).